

**DER KOPPLUNGSPROZESS ZWISCHEN INSULINBINDUNG
UND INSULINWIRKUNG AUF DEN GLUCOSETRANSPORT**
Untersuchungen an Fettzellen der Ratte

Eberhard Biermann

1982
—



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41548326_0040

Aus dem Institut für Diabetesforschung München

Vorstand: Prof. H. Mehnert

Prof. O. Wieland

DER KOPPLUNGSPROZESS ZWISCHEN INSULINBINDUNG
UND INSULINWIRKUNG AUF DEN GLUCOSETRANSPORT.
UNTERSUCHUNGEN AN FETTZELLEN DER RATTE

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Eberhard Biermann

aus

Daaden

München 1980

Mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin der Universität
München

Berichterstatter: Priv.Do. Dr.W. Kemmler

Mitberichterstatter: Prof. Dr. H. Mehnert

Dekan: Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 12. November 1982



Herrn Priv.Do. Dr. W.Kemmler danke ich für die Überlassung des Themas und die freundliche Aufnahme in seine Gruppe am Institut für Diabetesforschung sowie die vielen anregenden Diskussionen.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. H.U.Häring für die in diesem Umfang sicherlich ungewöhnliche Diskussions- und Gesprächsbereitschaft.

Sehr gefreut habe ich mich über die nützlichen Gespräche um die theoretischen Hintergründe mit meinen Freunden Andreas Clad und Manfred Simons.

INHALTSVERZEICHNIS

	<u>Seite</u>
1. <u>Einleitung und Zielsetzung</u>	2
2. <u>Material und Methoden</u>	5
2.1.1. Chemikalien	5
2.1.2. Geräte	6
2.2. Herstellung isolierter Fettzellen	7
2.3. Messung des Glucosetransportes	7
2.3.1. Ermittlung von experimentellen Parametern zur Optimierung der Versuchsbedingungen	
2.3.1.1 Methylglucoseverteilungsräume	9
2.3.1.2 Ermittlung des Ausstroms von Methylglucose nach Zugabe von Phloretin-Stopper-Lösung	11
2.3.1.3 Variation der Durchmischungs-technik	13
2.4. Bestimmung der Insulinbindung an Adipozyten	14
2.5. Ermittlung der zellulären ATP-Spiegel in Adipozyten unter dem Einfluß von Atmungsketteninhibitoren	15
3. <u>Ergebnisse</u>	
3.1. Analyse der Transportkinetik und Bestimmung der kinetischen Parameter	16
3.2. Bestimmung der effektiven Mischungszeit	23
3.3. Gegentransport	25
3.4. Zeitverlauf der Aktivierung des Transports	29
3.5. Temperaturabhängigkeit der Aktivierungsphase	32
3.6. Bindung und Transportaktivierung unter intrazellu- lärem ATP-Entzug	34
3.6.1. Wirkung von Atmungsketteninhibitoren auf den zellulären ATP-Spiegel	34
3.6.2. Die Insulinbindung unter dem Einfluß von ATP-Entzug	
3.6.3. Bestimmung der Hormonaktivierung des Glucose- transports unter ATP-Reduktion	38

3.7. Insulinbindung unter Chloroquineinfluß	42
3.8. Die Rolle des Calciums bei der Insulinwirkung	45
3.9. Stimulation des Glucosetransports bei verminderter Rezeptorendichte	47
4. <u>Diskussion</u>	51
4.1. Das Glucosetransportsystem	52
4.2. Die Insulinbindung und das Konzept der Internalisierung	53
4.3. Kopplung von Bindung und Wirkung	57
5. <u>Anhang</u>	68
5.1 Extrapolationsverfahren zur Ermittlung der Anfangsge- schwindigkeit des Einstroms von 3-O-Methylglucose	68
5.2 Zusammenstellung von Literaturangaben über die Parameter des Glucosetransportsystems für 3-O-Methylglucose	69
5.3 Modelle und theoretische Berechnungen	70
5.3.1. Grundgleichungen einer Aktivierungsreaktion bei der Transportstimulation	71
5.3.2. Mögliche Mechanismen der Hormonstimulation	73
5.3.3. Modell einer Kopplung von Bindung und Wirkung	77
5.3.4. Die initiale Latenzzeit im Arrheniusdiagramm	80
6. <u>Zusammenfassung</u>	83
7. <u>Literaturverzeichnis</u>	86
8. <u>Abkürzungen</u>	91

1. EINLEITUNG UND ZIELSETZUNG

Insulin reguliert in den Zellen seiner Zielorgane Muskel-, Fett-, und Lebergewebe Membranfunktionen wie den Transport von Glucose, Aminosäuren und Ionen, übt anabole Effekte auf den Stoffwechsel aus und steuert die Synthese verschiedener Zellproteine. Allen Wirkungen gemeinsam ist vermutlich die primäre Kopplung des Hormons an einen insulinspezifischen Rezeptor in der Plasmamembran der Zielzellen. Welche Mechanismen das "Insulinsignal" hinter dem Rezeptor weiterleiten, und ob es ein einheitliches Signal für alle verschiedenen Wirkungen gibt, ist zum größten Teil noch unklar (Abb.1).

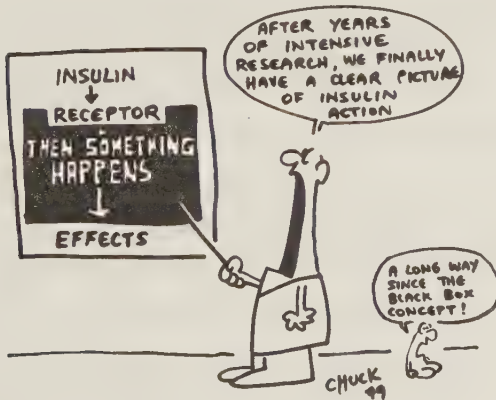


Abb. 1: (aus TIBS Nov.1979)

Die Kenntnis dieser Mechanismen ist jedoch von klinisch praktischer Bedeutung, da bei der Pathogenese sowohl des Altersdiabetes wie auch des juvenilen Diabetes eine Resistenz gegen Insulin auf zellulärer Ebene eine entscheidende Rolle spielt. Ursachen dieser Resistenz sind zum Teil Änderungen der Rezeptorbesetzung, dazu aber auch Veränderungen in der Weitergabe des Insulinsignals "hinter dem Rezeptor".

In der vorliegenden Arbeit wurde die Weiterleitung des Insulinsignals auf das Glucosetransportsystem untersucht. Dieses in der Membran lokalisierte System steht am Beginn des Kohlenhydratstoffwechsels und läßt sich experimentell ebensogut erfassen wie die Insulin-Rezeptorbindung.

Folgende Mechanismen, die bei dem Signaltransfer eine Rolle spielen könnten, wurden diskutiert:

- Rezeptor-Lateralbewegung (49)
- Rezeptor-Rezeptor (32) oder Rezeptor-Effektorkopplung (30)
- Internalisierung von Rezeptor und Insulin (24, 43, 54)
- Phosphorylierung von Zellproteinen (2, 13)
- Änderungen des Redoxzustandes (13, 41)
- Änderungen der Mikroviskosität der Membran (46)
- Ionenverschiebungen (8, 13)
- Einfluß von Degradationsprodukten (56) oder
- eines "second messengers" (13, 39)

Die erste Aufgabe dieser Arbeit war es, eine kürzlich beschriebene neue Messmethode für den Glucosetransport (62) zu optimieren und damit das Glucosetransportsystem näher zu charakterisieren.

Die Stimulation des Transportes erfolgt nach einer charak-

teristischen Latenzzeit von 40-50 sec nach Hormonzugabe. Eine verzögerte Bindung konnte für diesen Effekt nicht verantwortlich gemacht werden, sodaß die Existenz der Latenzphase zu der Hypothese eines zwischen Rezeptor und Effektor liegenden Transmitterschrittes geführt hat (7,22,25).

Diese Latenzphase kann durch niedrige Insulinkonzentrationen und Temperaturerniedrigungen verlängert werden. Ebenso führen antimikrotubuläre Substanzen wie Vinblastin und Colchizin zu einer länger dauernden Latenzzeit, was auf eine Mitwirkung der Mikrotubuli an der Hormonaktivierung hindeutet (26).

Neben einer genauen Analyse des Aktivierungsvorganges unter Normalbedingungen bestand ein weiterer Teil der Arbeit darin, den Einfluß von

- ATP- Mangel
- Ca^{++} - Mangel
- Änderung der Oberflächendichte von Rezeptoren
- systematischen Temperaturveränderungen

auf die Latenz- und Aktivierungsphase zu untersuchen, um so Rückschlüsse auf die Beteiligung dieser Faktoren an der Signalübermittlung machen zu können.

Als ein weiterer Aspekt wurde in die Untersuchungen die Frage miteinbezogen, die die Internalisierung von Protein-Rezeptorkomplexen betrifft. Bekannt ist dieses Phänomen von Low-density-Lipoproteinen (23) und vom Epidermalen Wachstumsfaktor (3). Ein ähnlicher Mechanismus wurde in neuerer Zeit auch vom Insulin berichtet (24).

Daher war als weiteres Ziel dieser Arbeit die Frage zu klären, ob eine Verbindung zwischen Aufnahme von Insulin in die Zelle und seiner Wirkung besteht.

2.1.2. Geräte

Inkubator	Gesellschaft für Labortechnik, Hannover
pH - Meter	Pusl, München
Zentrifugen	Hettich, Rotixa Eppendorf Tischzentrifugen
Quanten - Zähler	Szintillationszähler: Packard Tri Carb Modell 13385 Mark II Nuclear Chicago γ - Zähler: Searle Analytic Inc.
Spektralphotofluorometer	Typ Aminco- Bowmann American Instruments Company
Programmierbarer Rechner	Texas Instruments TI 57
Zuchttiere	Sprague Dawley Ratten Fa. Egon Jautz, Kissleg

2.2 Herstellung isolierter Fettzellen

Die Präparation von isolierten Fettzellen wurde nach der Methode von Rodbell (46) durchgeführt; in Abwandlung wurde jedoch Hepes-Puffer verwendet.

Männliche Sprague-Dawley Ratten (140 - 180 gr) wurden durch Dekapitation getötet und der epididymale, zum Teil auch der retroperitoneale Fettkörper herauspräpariert. Das Fettgewebe wurde in 37°C warmen Hepes-I-Puffer eingebracht, in dem 2mg/ml Kollagenase gelöst war. Nach Begasen mit einem Gemisch von 95% O₂ und 5% CO₂ zur pH-Einstellung auf 7,4 wurde das Gewebe eine Stunde lang im Wasserbad (37°C) bei einer Schüttelfrequenz von 100/min inkubiert. Dabei lösen sich die Zellen aus dem Bindegewebsverband und durch milde Zentrifugation konnten die Adipozyten vom übrigen Medium und vom Stroma getrennt werden. Vier-maliges Waschen in Hepes-II-Puffer und anschließendes Dekantieren erlaubte ein fast vollständiges Auswaschen der Kollagenase und der Bindegewebsfragmente. Die im Rückstand erhaltene Zellsuspension enthält etwa 5×10^6 Zellen pro ml.

2.3 Messung des Glucosetransportes

Zur Ermittlung der Transportrate des Glucosetransportsystems wurde ¹⁴C markierte 3-O-Methyl(D-)Glucose verwendet, welche im Adipozyten bis zum Extrazellulärwert akkumuliert, ohne weiter metabolisiert zu werden. Das von Whitesell et al. (62) beschriebene Messverfahren wurde für die hier notwendigen Anforderungen modifiziert.

In Plastikreagenzgläser (Ø=10mm) wurde 50µl 3-O-Methyl-¹⁴C]glucose gefüllt, und diese wurden ins 37°C warme Wasserbad gestellt. (Endkonzentration im Test: 0,5 mM, spez. Aktivität 0,1µCi/ml). Die Zuckeraufnahme wurde durch Einpipettieren von 100 µl gepackter Zellsuspension (Zellvolumen zu Extrazellulärvolumen Verhältnis 1:1) gestartet. Durch nochmaliges schnelles Aufsaugen und Rückpipettieren konnte eine ausreichend gute Durchmischung erzielt werden (siehe 2.3.1.3). Der Stopp der Aufnahme erfolgte durch rasches Verdünnen mit 5 ml Kochsalzlösung (0,9%) mit einem Zusatz von 0,3 mM Phloretin (pH 7,4). Zwei Mechanismen werden hier wirksam: Durch Rückverdünnung verringert

sich die extrazellulär gebundene Aktivität um etwa den Faktor 30, während Phloretin als spezifischer Inhibitor des Glucosetransportes den Ausstrom aus dem Intrazellulärraum fast vollständig hemmt. Anschließend wurde mit Silikonöl (Dichte 0,99) überschichtet und nach spätestens 3 min mit 600g für 30 Sekunden zentrifugiert. Die sich auf dem Öl absetzende Zellschicht wurde sogleich mit einer Pipette abgesaugt und in ein Zählröhrchen gebracht. Nach Zugabe von 10 ml Szintigel wurde die Aktivität im β -Spektrometer bestimmt. Es wurden insgesamt 4000 Zählimpulse gezählt, sodaß statistisch ein Zählfehler von 2% resultiert. Nach der Zentrifugation durch das Silikonöl enthält die Zellschicht noch einen Restanteil an extrazellulärem Wasser mit aktiver 3-O-MG. Dieser extrazelluläre Anteil wurde dadurch ermittelt, daß in einer Kontrollprobe der Einstrom in Gegenwart der Hemmsubstanz Phloretin bestimmt wurde. Der so bestimmte Wert sollte den Extrazellulärwert plus einen durch Restdiffusion in die Zelle gelangten Anteil repräsentieren. Es konnte gezeigt werden, daß für Messzeiten unter 1 Minute, wie sie in unserem Fall erforderlich waren, dieser Wert keine Zeitabhängigkeit zeigte. Daraus ist zu schließen, daß die Hemmung des Transportes durch Phloretin ausreichend groß ist, und der durch einfache Diffusion einströmende Anteil vernachlässigbar ist. Der auf diese Weise ermittelte Wert repräsentiert also fast vollständig die extrazelluläre Aktivität.

Zur Aufnahme der Kinetik der Insulinwirkung wurde die vorausberechnete Menge an Zellsuspension (meist 2ml) unter mildem Schütteln bei 37°C in guter Durchmischung gehalten. Zum Zeitpunkt $t = 0$ wurde Insulin zugegeben und dann nach jeweils 15sec je eine Probe entnommen und nach obigen Verfahren der Nettoeinstrom von 3-O-MG über 5sec ermittelt. Der in dieser Zeit erfolgte Einstrom wurde mit dem oben beschriebenen Extrazellulärwert korrigiert und prozentual auf den Gleichgewichtswert bezogen. Dazu wurde bei jeder Versuchsreihe ein Gleichgewichtswert (Aufnahmezeit $t \gg$ Halbwertszeit) und ein Extrazellulärwert mitgemessen.

2.3.1 Ermittlung von experimentellen Parametern zur Optimierung
der Versuchsbedingungen

2.3.1.1 Methylglucoseverteilungsräume

Um absolute Transportraten und Verdünnungsfaktoren bei Zugabe von Zellsuspension bestimmen zu können, ist die Kenntnis der intra- und extrazellulären Methylglucoseverteilungsräume erforderlich.

Durch eine einfache Verdünnungsmethode konnten unter Verwendung von markierter 3-O-MG folgende Größen bestimmt werden:

- a) intrazellulärer Methylglucoseverteilungsraum
- b) extrazellulärer Methylglucoseverteilungsraum
(nicht abzentrifugierbarer Rest)
- c) relatives Gesamtzellvolumen der Suspension

Dazu wurden, wie in 2.3 beschrieben, 100 µl in 50 µl [¹⁴C]-3-O-MG pipettiert, deren Aktivität bekannt war. Nach 30 min Äquilibrierung wurden zu jeweils einer Probe 50, 100, 200 und 500 µl Phloretinlösung zugesetzt und nach Ölüberschichtung zentrifugiert. Die Zellen wurden ebenso wie 50 µl aus dem Unterstand der Radioaktivitätsbestimmung zugeführt.

Zur graphischen Ermittlung obiger Größen wurden folgende Verdünnungsgleichungen aufgestellt:

$$<2.1> \quad Z_{\text{gesamte Zellen}} = Z_{\text{intrazell.}} + Z/\mu\text{l}_{\text{extrazell.}} \times \text{Vol}_{\text{extraz.}}$$

$$<2.2> \quad Z_{\text{intrazell.}} = \text{Vol}_{\text{intraz.}} \times Z/\mu\text{l}_{\text{intraz.}}$$

Dabei gilt, daß im Gleichgewicht die volumenbezogene intrazelluläre Zählrate $Z/\mu\text{l}_{\text{intraz.}}$ gleich der extrazellulären Zählrate ist:

$$<2.3> \quad \frac{Z}{\mu\text{l}_{\text{intraz.}}} = \frac{Z}{\mu\text{l}_{\text{extraz.}}} \quad (\text{vor der Rückverdünnung})$$

Trägt man die Zählrate der gesamten Zellen Z_{ges} gegen $Z/\mu\text{l}_{\text{extraz.}}$ auf, so ergibt sich aus der Geradensteigung das Extrazellulär-

volumen, der Ordinatenabschnitt entspricht der intrazellulären Zählrate. Mit Gl. 2.2 und 2.3 kann daraus leicht das intrazelluläre Volumen berechnet werden (Abb. 2.1).

Zellen μl	3-O-MG μl	Phloretin-Lsg μl	Zählrate Zellen cpm	Zählrate UST cpm/μl
100	50	-	4270	1220
100	50	50	3430	820
100	50	100	3050	610
100	50	200	2610	410
100	50	500	2170	210

Tab. 2.1 Pipetierschema und Zählraten (MW aus n = 6)

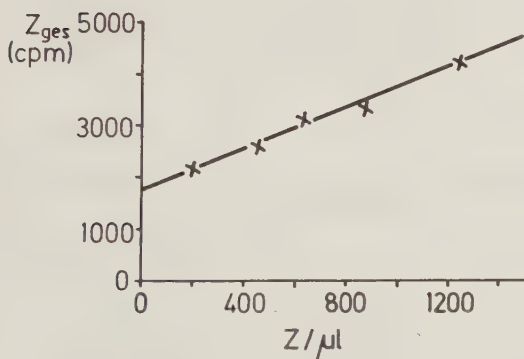


Abb. 2.1 Radioaktivität Z_{ges} der Zellen als Fkt. der volumenbezogenen Zählrate Z im Unterstand nach Gl. 2.1. Aus dem Ordinatenabschnitt ergibt sich $Z_{intra} = 1740$ cpm. Aus der Steigung folgt $V_{extra} = 2,1 \mu l / 100 \mu l$ Susp. Daraus berechnet sich (wegen Gl. 2.3) $V_{intra} = \frac{1740}{1220} = 1,42 \mu l / 100 \mu l$ Sus.

Das Verhältnis von Gesamtzellvolumen zu extrazellulärem Wasser ergibt, daß die Zählrate im Unterstand (UST) umgekehrt proportional zum Gesamtvolumen ist:

$$<3.4> \quad \frac{1}{Z} = k V_{ges} = k (V_z - V_x)$$

V_z = Summe aller zugesetzten Volumina

V_x = abzentrifugiertes Zellvolumen

Nach dem Auftragen von V_z über der reziproken Zählrate erhält man als Ordinatenabschnitt das unbekannte Zellvolumen (Abb. 2.2)

$$V_x = 50 \mu l$$

(Dies entspricht bei 100 μl Suspension einem Packungsgrad von 1:1).

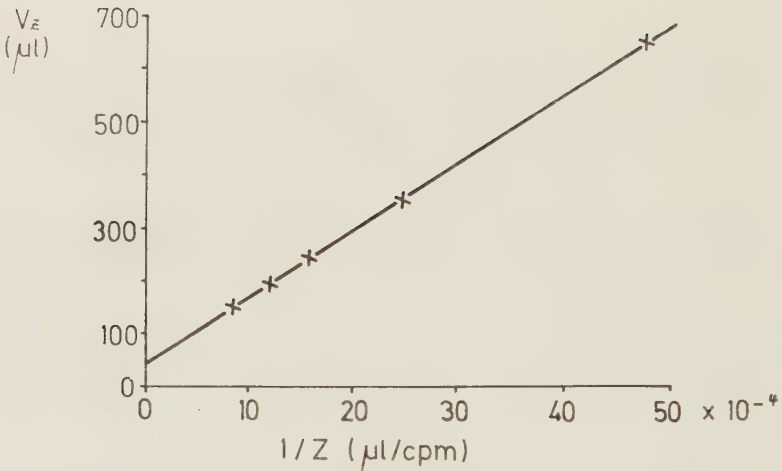


Abb. 3.2: Zugesetzte Gesamtvolumina V_z als Fkt. der reziproken Zählrate $1/Z$ im Unterstand.^z Aus dem Ordinatenabschnitt ergibt sich ein Zellvolumen V_x von ca. 50 μl

Die Ergebnisse ergeben in Zusammenfassung

- a) Intrazellulärer Verteilungsraum 1,45 $\mu\text{l}/100\mu\text{l}$ Susp.
- b) Extrazellulärer Verteilungsraum 2,1 $\mu\text{l}/100\mu\text{l}$ Susp.
- c) Verhältnis Zellvol./Extrazell.raum ca. 1 : 1

Das Ergebnis von b) zeigt, daß nach einer etwa 50-fachen Rückverdünnung mit Stopperlösung die extrazelluläre Zählrate (siehe Abschnitt 3.2) knapp unter 3% der intrazellulären Zählrate des Gleichgewichtswertes liegen sollte, was in allen Experimenten gut erfüllt war. Mit anderen Methoden wurde von Gliemann et al. (20) ähnliche Ergebnisse erzielt.

2.3.1.2 Ermittlung des Ausstroms von Methylglucose nach Zugabe von Phloretin-Stopper-Lösung

Die Verlässlichkeit der verwendeten Transportmessung hängt wegen der erforderlichen kurzen Messzeiten wesentlich davon ab, wie sicher sich Anfangs- und Endpunkt der Aufnahmeperiode festlegen lassen. Im Folgenden wird daher die Wirksamkeit der Terminierungs-

reaktion untersucht. Die für den Start der Reaktion wichtige Durchmischungszeit wird erst im Abschnitt 3.2 behandelt, weil bisher die hierfür notwendigen theoretischen Grundlagen noch nicht behandelt wurden.

a) Das Ausmaß des Ausstroms von intrazellulärer Aktivität zwischen Zugabe der phloretinhaltigen Stopperlösung und Zentrifugation wurde durch Variation dieser Rückdiffusionszeiten ermittelt.

b) In einer zweiten Versuchsreihe wurde untersucht, ob notwendigerweise Hepes-Puffer oder zur Vereinfachung lediglich physiologische Kochsalzlösung als Lösungsmittel für Phloretin notwendig sind.

zu a)	Verweilzeit	Zählrate (cpm) $\pm$ 5
	sofort(max. 1 min)	MW aus N = 3 1389 $\pm$ 120
	5 min in NaCl	1419 $\pm$ 33
	10 min + Phloretin	1278 $\pm$ 64
	20 min $\downarrow$	1299 $\pm$ 39
	30 min	1054 $\pm$ 91
zu b)	10 min NaCl-Phloretin	1511 $\pm$ 71
	10 min Puffer-Phloretin	1457 $\pm$ 134

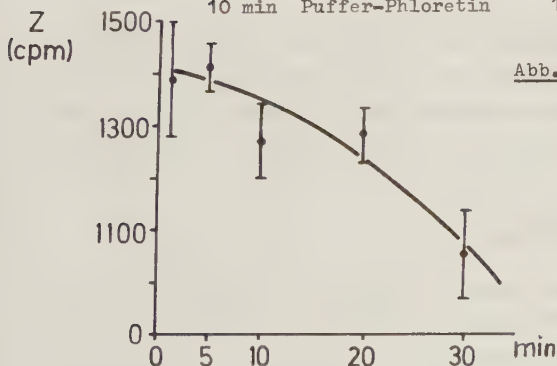


Abb. 2.3: Zellulärer Aktivitätsverlust nach Zugabe von Stopperlsg. bei $t = 0$

Der Ausstrom in a) erwies sich als so gering, daß kein Fehler entstehen dürfte, wenn die maximale Verweilszeit wie in unserem Falle auf 3 Minuten festgelegt wurde.

b) Im Rahmen der Meßgenauigkeit konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden angegebenen Lösungen für Phloretin

festgestellt werden, sodaß hier abweichend von Whitesell (62) die Entscheidung zu Gunsten von 0,9% NaCl-Phloretin-Lösung fiel. Dieser Autor wies nach, daß eine minimale Hemmkonzentration von 0,3 mM Phloretin notwendig ist, daß daneben aber auch eine Albuminkonzentration von mehr als 0,2% den Hemmeffekt teilweise wieder aufhebt. Im vorliegenden Fall lag die Albuminkonzentration jedoch nur bei ca. 0,05%.

Das Zufügen der Kochsalzlösung mit dem Inhibitor Phloretin ist ein geeignetes Mittel, die Glucoseaufnahme schnell zu stoppen, wobei der Fehler durch den dann einsetzenden Ausstrom bei Einhaltung kurzer Verweilzeiten im Stoppermedium vernachlässigbar bleibt. Zudem wird durch diese Prozedur die extrazelluläre Aktivität sehr stark rückverdünnung, sodaß die im β -Spektrometer bestimmte Aktivität überwiegend aus der intrazellulären Aktivität besteht.

2.3.1.3 Variation der Durchmischungs-technik

Wie in 2.3.1 beschrieben, wurde die Zellsuspension nach Einspritzen in die 3-O-MG-Lösung erneut aufgezo- gen. Der Grund hierfür wird deutlich, wenn man die 5sec Einstromraten mit und ohne Wiederaufziehen in die Pipettenspitze miteinander vergleicht:

5sec-Aufnahme (Insulin-stimuliert)		cpm $\pm$ 5
ohne Wiederaufziehen	200 μ l Spitze	236 $\pm$ 36
mit Wiederaufziehen		427 $\pm$ 49 (N=6)

Hieraus ergibt sich, daß der Durchmischungsgrad zu Beginn der Glucoseaufnahme von entscheidender Bedeutung ist, da ohne erneutes Wiederaufziehen 45% weniger Glucose aufgenommen wird. Ein zweites Wiederaufziehen führte zu keiner nennenswerten Steigerung der 5sec-Aufnahmerate und erübrigte sich daher.

2.4 Bestimmung der Insulinbindung an Adipozyten

Die Bindung von Insulin an die Rezeptoren der Fettzelle wurde mit ^{125}J -Insulin untersucht. Es wurden einerseits Assoziations- und Dissoziationsstudien gemacht, andererseits die Bindung unter Gleichgewichtsbedingungen untersucht, um Rezeptoraffinität und maximale Bindungskapazität zu ermitteln. In beiden Fällen wurden Fettzellen in einer Konzentration von $4,5 - 5,5 \times 10^5/\text{ml}$ bei 37°C in einem Magnetrührer in Suspension gehalten.

a) Assoziation und Dissoziation

Zum Start der Assoziation wurde in diese Suspension eine Menge an ^{125}J -Insulin pipettiert (Endkonzentration $100\mu\text{E}/\text{ml}$, $25\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$). Portionen von $400\mu\text{l}$ wurden in Polyäthylenröhrchen überführt und zum Terminierungszeitpunkt der Assoziation in einer Tischzentrifuge bei 10000 g durch $100\mu\text{l}$ Dionylphtalat zentrifugiert (20). Die Dichte dieses Öls liegt mit $0,98$ zwischen Wasser und Fett, sodaß sich 3 Schichten bilden. Nach Durchschneiden des Röhrchens in der Ölschicht wurde die Aktivität des zellulären Überstandes in einem γ -Zähler bestimmt. Um die unspezifische nicht rezeptorgebundene Aktivität zu ermitteln, wurde eine Probe mit einem Überschuß an unmarkiertem Insulin ($1\text{ E}/\text{ml}$) versetzt. Dieser Anteil setzt sich zum Teil aus in den Extrazellulärraum verschlepptem, teils aus irreversibel an die Membran adsorbiertem Insulin zusammen. Die Dissoziation des gebundenen markierten Insulins wurde durch Zufügen von unmarkiertem überschüssigem Insulin ($1\text{ E}/\text{ml}$) eingeleitet und dann wie oben beschrieben weiter verfahren.

b) Gleichgewichtsbindung

Zur Ermittlung eines "Scatchard-Plots" ist die Untersuchung der Bindung unter Gleichgewichtsbedingungen bei verschiedenen Insulinkonzentrationen erforderlich. Dieser Plot beruht auf dem Massenwirkungszusammenhang:

$$\frac{B}{F} = K (R - B)$$

B, F = gebundenes bzw.
freies Insulin

K = Massenwirkungs-
konstante (Affinität)

R = Rezeptorkonzentration

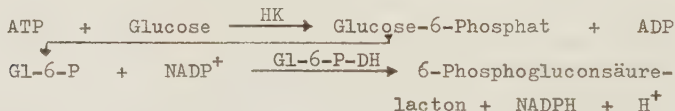
Beim Auftragen von B/F über B sollte sich R als Abszissen-

schnittpunkt ergeben, worauf in Abschnitt 3.9 Bezug genommen wird.

400µl verdünnte Zellsuspension (Konz. ca. 5×10^5 /ml) wurde mit 50µl markiertem Insulin zu einer Endkonzentration von 5 bis 10 000 µE/ml (spez. Aktivität 260 µCi/µg) versetzt. Die Proben wurden für 45 min in einem Wasserbad bei 25°C gehalten. (Anmerkung: bei früheren Messungen war das Gleichgewicht bei allen Konzentrationen erreicht) Trennung von Zellen und Medium und Radioaktivitätsbestimmung geschah wie oben beschrieben.

2.5 Ermittlung der zellulären ATP-Spiegel in Adipozyten unter dem Einfluß von Atmungsketteninhibitoren

Für die ATP-Messung wurde eine enzymatische Methode von Lamprecht und Trautschold(38) modifiziert. Das Prinzip geht aus den beiden folgenden Gleichungen hervor.



Bezüglich der Einzelheiten sei auf die oben zitierte Literatur verwiesen, es sollen hier nur die wesentlichen Schritte dargestellt werden.

400µl Zellsuspension wurde mit 2ml 12% Perchlorsäure enteiweißt, zentrifugiert und der Unterstand abdekantiert und neutralisiert. Die stöchiometrisch entstehende NADPH-Menge wurde in einem Fluoreszenzspektrometer bei 366 nm ermittelt. Dazu wurde zuvor eine Eichkurve mit Hilfe bekannter ATP-Konzentrationen aufgenommen. Im Testansatz (3ml) befanden sich vor der Messung: Triäthanolaminpuffer 785-865µl, NADP-Lsg. 50µl (1mM), MgCl_2 -Lsg. 50µl (5mM) Probe 20-100µl, Gl-6-P-DH 5µl, Glucoselsg. 5µl (50mM), Reaktionsstart mit 5µl Hexokinase. Die Kinetik des Absinkens der ATP-Spiegel durch Inhibitoren wurde folgendermaßen bestimmt: Zum Zeitpunkt $t = 0$ wurde die Zellsuspension mit Inhibitor (KCN od. DNP) versetzt. Das dadurch initiierte Absinken der ATP-Spiegel wurde durch Enteiweißung in Perchlorsäure beendet und die ATP-Konzentration zu diesem Zeitpunkt wie oben beschr. ermittelt.

3. ERGEBNISSE

3.1 Analyse der Transportkinetik und Bestimmung der kinetischen Parameter

Der Einstrom von 3-O-Methylglucose in Methylglucose-freie Fettzellen erfolgt durch "erleichterte Diffusion". Die Einstromrate wird durch Anwesenheit von Insulin beträchtlich erhöht. In Abb. 3.1A bzw. 3.2A ist die Kinetik des 3-O-MG - Einstromes in Adipozyten ohne und in Gegenwart von Insulin (100 µE/ml, 10min vorink.) für verschiedene Konzentrationen von Methylglucose dargestellt. Die Tracerkonzentration war jeweils konstant, sodaß sich in allen Fällen derselbe Gleichgewichtswert ergab, der hier mit 100 % angegeben wird.

Der Glucosetransport kann unter der Annahme, daß ein membranständiger Carrier die Transportfunktion übernimmt, mit einer einfachen Sättigungskinetik beschrieben werden:

$$< 3.1 > \quad v \equiv \frac{ds_i}{dt} = V_{\max} \left[\frac{s_e}{s_e + K_T} - \frac{s_i}{s_i + K_T} \right]$$

s_e =externe
 s_i =interne
 Zuckerkonz.

Dieses einfachste Modell hat lediglich die beiden Größen K_T , die Affinitätskonstante des Transportes, und $V_{\max}$, die Maximalgeschwindigkeit des Transportes, als Parameter. Diese Transportkinetik wurde schon vielfach untersucht (12,40,51,59,62) und die Parameter K_T

und $V_{\max}$ für den basalen und stimulierten Transport bestimmt. Dabei wurde vorallem der Gleichgewichtsaustausch gewählt ($s_e = s_i$, nur ein Tracer wird bei $t=0$ zugesetzt), da sich unter diesen Bedingungen ein monexponentieller Zusammenhang in der integrierten Form von Gl.<3.1> ergibt. Die bekannteste Methode zur Ermittlung von K_T und $V_{\max}$ ergibt sich aus der Auftragung der Daten nach Lineweaver-Burk, wobei bei Veränderungen der externen Konzentration s_e jeweils die Anfangsgeschwindigkeit gemessen wird, solange der Ausstrom gering ist, also der 2.Term in Gl.<3.1> vernachlässigt werden kann.

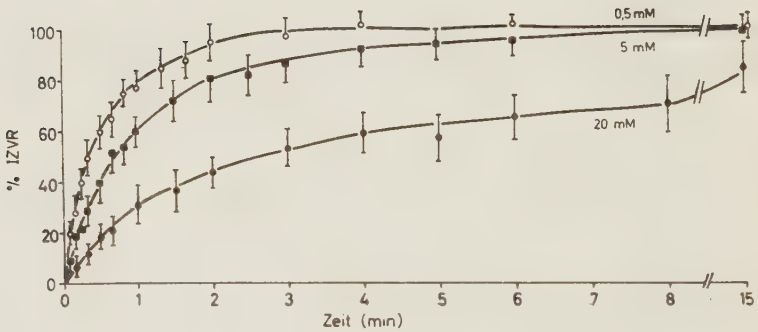
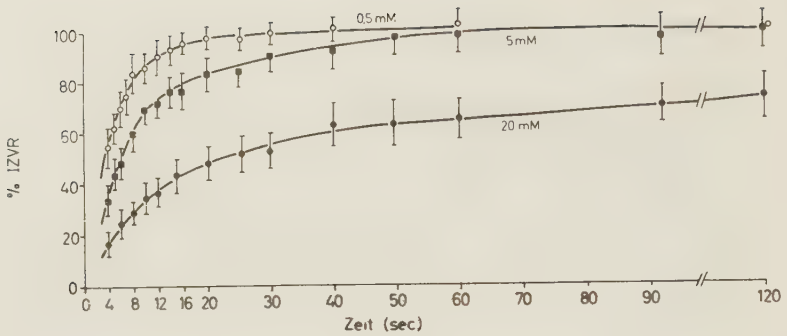


Abb. 3.1A(oben) und 3.2A(unten):

Transportkinetik für 3-O-Methylglucose ohne (3.1) und mit Anwesenheit von 100 μ E/ml Insulin (3.1). Externe 3-O-MG Konzentration 0,5mM ($\circ$), 5mM ($\blacksquare$), 20mM ($\bullet$), Ordinate: prozentuale Füllung des intrazellulären Methylglucoseverteilungsraumes (IZVR). Mittelwerte aus N=5 Experimenten $\pm$ Standardabweichung T = 37°C.

Da der Ausstrom aus den Zellen sofort beginnt, nachdem Substrat ins Zytoplasma gelangt ist, wird man bei allen endlichen Meßzeiten grundsätzlich eine zu kleine Anfangsgeschwindigkeit messen. Um an die "wahre" Anfangsgeschwindigkeit heranzukommen, wurde bisher versucht die Messzeiten experimentell zu verringern (zB. White-sell et al.(62) 1-2 sec). Hier sind jedoch insbesondere bei Insulin-stimulierten Zellen, welche schon nach ca. 3sec zur Hälfte mit Substrat gefüllt sind, experimentell Grenzen gesetzt.

Eine Aufgabe dieser Arbeit war es nun, alternativ dazu mathematische Methoden zur Ermittlung von K_T und V_{max} zu entwickeln. Einerseits wurde ein Extrapolationsverfahren verwendet, mit dem aus definierten zeitlichen Messpunkten die Anfangsgeschwindigkeit berechnet werden kann. Andererseits wurde ein mathematisches Linearisierungsverfahren erarbeitet, das auf eine solche Anfangsgeschwindigkeitsbestimmung gänzlich verzichtet.

Zur Erstellung eines Lineweaver-Burk-Diagrammes wurden bei jeder externen 3-O-MG Konzentration jeweils 4 Messwerte in äquidistanten Zeitabständen aufgenommen und dann die jeweilige Anfangsgeschwindigkeit mit einer Extrapolation nach Newton berechnet (nach Kotyk u. Janacek(37), im Anhang näher erläutert). In Abb.3.3 erkennt man einen linearen Zusammenhang zwischen der reziproken Substratkonzentration und der reziproken Geschwindigkeit. Die aus den Achsenabschnitten berechneten Parameter für den Transport sind in Tabelle 3.1 dargestellt.

Tab. 3.1

Transportparameter nach Lineweaver-Burk aus Abb. 3.3, MW aus $n=5 \pm$ Standardabweichung.

	Basal	Insulin stimul.	
V_{max}	$0,22 \pm 0,04$	$1,7 \pm 0,35$	$\frac{mM}{sec}$
K_T	$6,6 \pm 1,2$	$7,1 \pm 1,4$	mM

Die Überprüfung des Modells und die Ermittlung der Transportparameter kann auch direkt aus der Kinetik bei einer definierten Konzentration erfolgen.

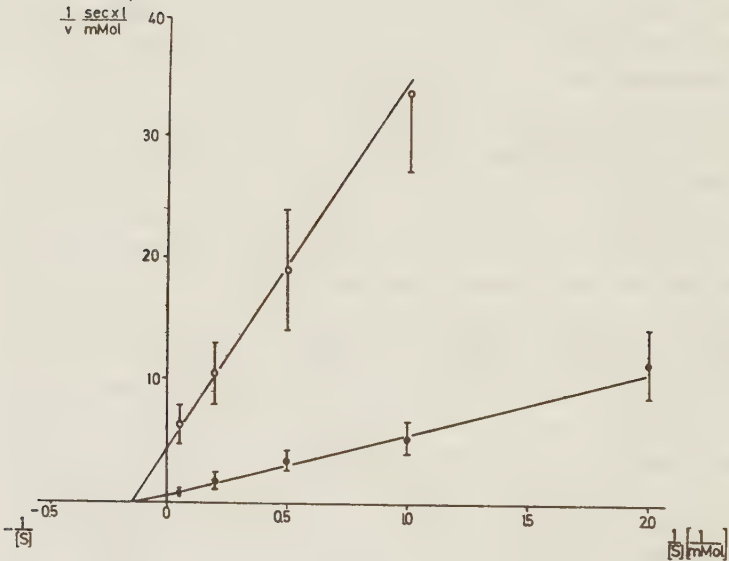


Abb. 3.3:

Diagramm nach Lineweaver-Burk für 3-O-Methylglucose. Reziproke Anfangsgeschwindigkeit $1/v$ als Funktion der reziproken Substratkonzentration $1/S$. Ohne (○) und mit (●) 100 µE/ml Insulin. MW aus N=5 Experimenten $\pm$ Standardabweichung. Aus den Schnittpunkten mit den Achsen ergeben sich $V_{\max}$ und K_T . (Tab. 3.1)

Im Gegensatz zum Gleichgewichtsaustausch findet sich beim Einstrom in leere Zellen nicht eine ebenso handliche linearisierte Form der Transportgleichung <3.1>. Die integrierte Form läßt sich nur implizit darstellen:

$$<3.2> \quad t = \frac{1}{V_{\max}} \left(\frac{S_e}{K_T} + 1 \right) \left[(S_e + K_T) \ln \frac{S_e}{S_e - S_i} - S_i \right]$$

und die Gleichung für die Halbwertszeit

$$<3.3> \quad t_{1/2} = \frac{1}{V_{\max}} \left(\frac{S_e}{K_T} + 1 \right) \left[\ln 2 (S_e + K_T) - \frac{1}{2} S_e \right]$$

enthält auch einen quadratischen Term in S_e . Andere Autoren (Eilam u. Stein, (15)) erreichten durch geschickte Auftragung von Gl. <3.2> eine Linearisierung, aus der K_T und $V_{\max}$ bestimmt werden können.

Für die hier vorliegenden Anforderungen wurde ein anderes Verfahren erarbeitet, welches direkt von Gl. <3.1> ausgehend eine weniger komplizierte Methode darstellt und zudem mehr auf die experimentellen Erfordernisse zugeschnitten ist, was im Folgenden deutlich wird. Dazu wurde Gl. <3.1> auf folgende Form gebracht:

$$<3.4> \quad \frac{1}{V} = \frac{dt}{dS_i} = \frac{1}{V_{\max}} \left(\frac{S_e}{K_T} + 1 \right) \left[(S_e + K_T) \cdot \frac{1}{S_e - S_i} - 1 \right]$$

Trägt man zu verschiedenen Zeiten $1/V$ gegen $1/(S_e - S_i)$ auf, so sollte die resultierende Gerade die Abszisse bei $x_0 = S_e + K_T$ und die Ordinate bei $y_0 = -\frac{1}{V_{\max}} \left(\frac{S_e}{K_T} + 1 \right)$ schneiden.

Neben der Tatsache, daß mit dieser Methode auch das Modell überprüft werden kann, bieten sich folgende Vorteile:

- Absolutwerte für S_i - und K_T -Wert sind nicht notwendig, nur Differenzen, daher entfällt auch das Abziehen
 - a) des Extrazellulärwertes
 - b) der Mischungszeit
- die Parameter ergeben sich durch lineare Extrapolation auf die Achsen
- zur Bestimmung von K_T und $V_{\max}$ ist prinzipiell nur eine Substratkonzentration notwendig (diese sollte $\gg K_T$ sein.).

In Abb. 3.1B bzw. 3.2B ist der nach Gl.<3.4> ermittelte Plot der Messwerte von Abb. 3.1A bzw. 3.2A dargestellt. In fast allen Fällen geht der anfänglich lineare Verlauf nach leichtem Abknicken wieder in einen linearen Verlauf etwas größerer Steigung über. Das Abbiegen deutet darauf hin, daß von diesem Zeitpunkt an weniger Methylglucose in die Zelle eintritt, als nach der Anfangsgeschwindigkeit zu erwarten wäre. Da dieser Effekt grundsätzlich nicht zeitabhängig oder konzentrationsabhängig zu sein scheint, ist hier eine genaue Analyse kaum möglich. Als Erklärung bietet sich einerseits die zu starke Vereinfachung des zugrunde liegenden Modells an, welches keine zeitliche Variation der Konzentration von Carriern und Carrier-Glucosekomplexen zuläßt. Auf der anderen Seite können intrazelluläre Verteilungsinhomogenitäten oder Inhomogenitäten der Austauschrate, von denen Vinten et al.(60) annahmen, daß sie einer Γ -Verteilung genügen, Ursache der Abweichung sein. Die aus den Achsenabschnitten von Abb.3.1B bzw. 3.2B ermittelten Parameter, sowie die aus Abb.3.1A bzw. 3.2A abgelesenen und aus Gl.<3.3>berechneten Halbwertszeiten sind in Tabelle 3.2 dargestellt.

	0,5mM *		5mM		20mM		Einheit
	ohne Insulin	mit Insulin	ohne Insulin	mit Insulin	ohne Insulin	mit Insulin	
V_{max}	0,165	1,2	0,23	2,0	0,21	1,85	$\frac{mMol}{litr \ sec}$
K_T	--	--	5,2	5,0	6,6	5,0	m. M
$HWZ_{exp.}$	20	3,5	42	6	155	22	sec
$HWZ_{theor.}$	23,5	3,2	39	4,5	162	20	sec

Tab. 3.2 Extrapolierte Parameter K_T und V_{max} aus Gl.<3.4>nach Abb.3.1B bzw. 3.2B. Experimentelle Halbwertszeiten für halbmaximale Füllung aus Abb.3.1A bzw. 3.2A. Theoretisch berechnete HWZ nach Gl.<3.3> unter Verwendung der darüberstehenden Parameter.
*Für 0,5mM konnte wegen des Schnittpunktes in Ursprungsnähe kein K_T ermittelt werden. V_{max} ergab sich aus der Geradensteigung.

Aus Tab.3.1 und 3.2 ist ersichtlich, daß Insulin die maximale Transportgeschwindigkeit um etwa das 8,5 fache erhöht, die Micha-

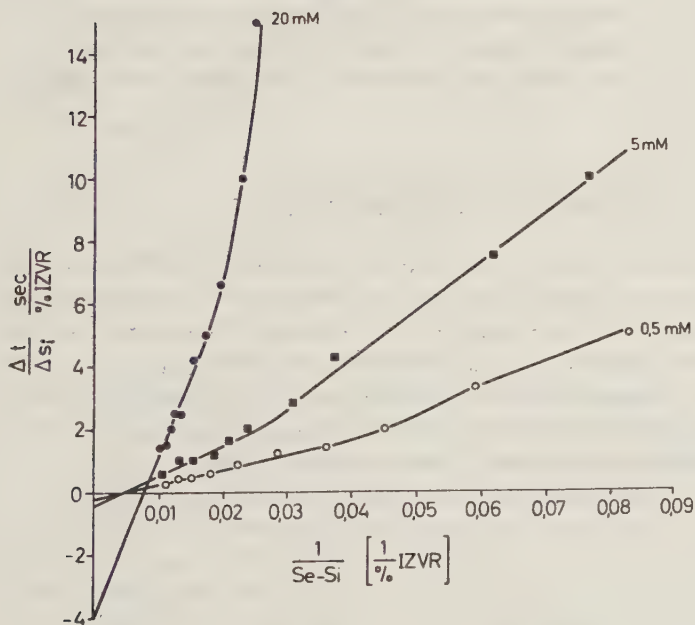
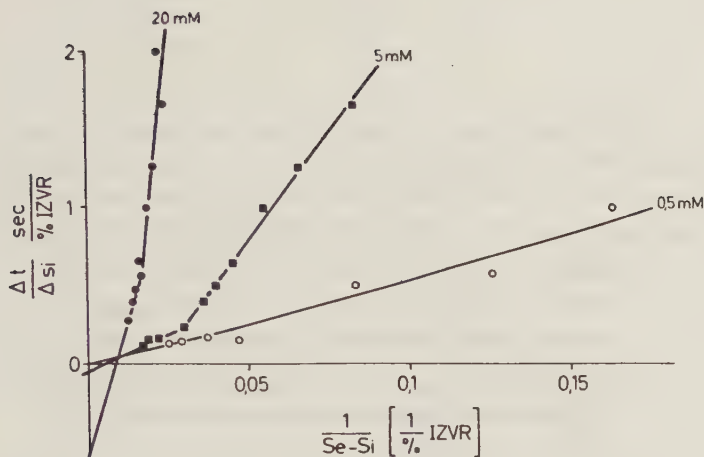


Abb. 3.1B (oben) und 3.2B (unten):

Nach Gl. 3.4 ermittelter Plot der Meßwerte von Abb. 3.1A und 3.2A (siehe Text).

eliskonstante kaum verändert. Auf die Bedeutung dieser in der Literatur oft berichteten Tatsache wird in der Diskussion noch eingegangen. Zu den verschiedenen Methoden, die hier zur Parameterbestimmung verwendet wurden, läßt sich folgendes sagen:

1. Beide Methoden, das Extrapolationsverfahren nach Kotyk und das neu entwickelte Linearisierungsverfahren liefern prinzipiell gleiche Ergebnisse.
2. Beide Methoden umgehen das experimentelle Problem der Meßintervallverkürzung zur Optimierung der Anfangsgeschwindigkeitsbestimmung.
3. Mit dem Linearisierungsverfahren ist bei einer externen Methylglucosekonzentration sowohl eine Modellüberprüfung wie auch eine Parameterbestimmung möglich, ohne daß Fixwerte (s.o.) der Zeit und Aktivität zur Subtraktion mitbestimmt werden müssen.

3.2 Bestimmung der effektiven Mischungszeit

In Abschnitt 2.3.1.2 wurde auf die Bedeutung der Festlegung von Anfangs- und Endzeitpunkt der Aufnahme-reaktion hingewiesen. Nachdem dort der Terminierungsschritt behandelt wurde, soll hier der Durchmischungsvorgang zum Startzeitpunkt untersucht werden. Mit einem im vorhergehenden Abschnitt dargelegten Linearisierungsverfahren der Transportgleichung läßt sich nun eine effektive Durchmischungszeit durch Extrapolation ermitteln.

Der Durchmischungsvorgang beginnt bei $t=0$ und nähert sich asymptotisch der vollständigen Durchmischung. Daher kann nur eine effektive Durchmischungszeit t_M angegeben werden, die hier dadurch definiert wird, daß sie den Schnittpunkt der linearisierten, experimentell ermittelten Transportkinetik mit der Zeitachse darstellt. Hierfür bietet sich Gl. <3.2> an, wenn der Term:

$$R \equiv \left(\frac{S_e}{K_T} + 1 \right) \cdot \left[(S_e + K_T) \cdot \ln \frac{S_e}{S_e - S_i} - S_i \right]$$

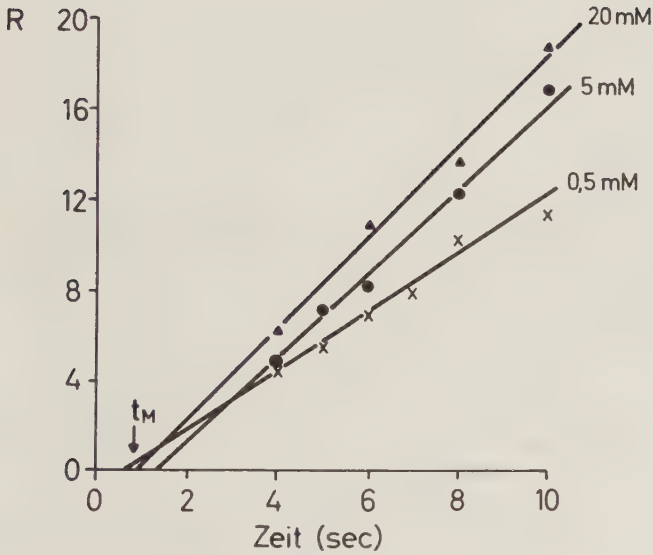


Abb. 3.4 : Plot zu Bestimmung der effektiven Mischungszeit t_M .
Lineare Regression von $R \Rightarrow t \cdot V_{\max}$ über t . Externe
3-O-MG Konzentration 20 mM ($\blacktriangle$), 5 mM ($\bullet$), und 0,5 mM ($\times$)
Insulin im Medium 100 μ E/ml im Medium. MW aus $N=5$.

über t aufgetragen wird. Als Steigung ergibt sich dabei $V_{\max}$. Wegen des schnelleren Einstromes wurden nur die insulinstimulierten Zellen herangezogen, deren effektive Durchmischungszeiten zwischen 0,6 und 1,3 sec wie Abb.3.4 zeigt. Als Mittelwert für t_M ergab sich

$$\underline{t_M = 0,9 \pm 0,3 \text{ sec}}$$

3.3 Gegentransport

Eine charakteristische Eigenschaft des Carrier-vermittelten Transportes ist der Gegentransport, bei dem ein hoher transmembranärer Konzentrationsgradient eines Substrates den Transport eines (meist markierten) Substrates kleiner Konzentration gegen ein Konzentrationsgefälle hervorruft.

Dieser "quasi-aktive" Transport hält solange an, wie die Differenz der chemischen Potentiale und damit die Freie Energie zwischen der "treibenden" Substanz und der "getriebenen" Substanz größer Null ist. Fällt die Konzentration des "treibenden" Substrates während der Reaktion ab, so stagniert der "Pumpvorgang" und es stellen sich anschließend wieder die normalen Gleichgewichtskonzentrationen ein. Der Effekt ist also unter diesen Umständen nur temporär, was sich auch im Experiment zeigt.

Es wurde schon früher beobachtet, daß vorgeladene Zellen einen beschleunigten Einwärtstransport und ein "Überschwingen" der Konzentration eines markierten Substrates aufweisen(4,9,61). Im Falle des nicht stimulierten Glucosetransportes wurde das Phänomen jedoch uneinheitlich interpretiert, zum Teil unter Annahme eines weiteren separaten Verteilungsraumes. Genaue theoretische Analysen liegen nur für den prinzipiell ähnlich verlaufenden "aktiven Transport" von Glucose im Dünndarm- und Nierentubulusepithel vor, wo Na-Ionen die Freie Energie bereitstellen und ein spezieller Carrier die Kopplung übernimmt (18,28). Es stellte sich daher die Frage, ob die experimentellen Daten mit einem theoretischen Modell, dem lediglich ein einfacher Carriermechanis-

mus zu Grunde gelegt wurde, übereinstimmen. Dieser Vergleich würde eine wichtige Information über den Transportmechanismus liefern und läßt eine Aussage zu, ob Zusatzannahmen zur Erklärung des Gegentransportphänomens notwendig sind.

Jeweils 2 ml gepackte Zellsuspension wurde mit oder ohne Insulin für ca. 60 min in 55mM 3-O-MG vorinkubiert. Parallel dazu wurden Kontrollzellen mit Puffer behandelt. 100µl der Suspension wurden zum Zeitpunkt t=0 in 0,8ml Puffer einpipettiert, in dem eine Tracerkonzentration von markierter 3-O-MG (ca. 50µM) enthalten war. Durch diese Prozedur wird die externe MG-Konzentration auf ca. 3,2mM erniedrigt und der Ausstrom der unmarkierten 3-O-MG beginnt. Die Aufnahme der markierten Methylglucose wurde nach den in Abb. 2.5 angegebenen Zeiten gestoppt.

Den theoretischen Zugang zu dem Vorgang des gekoppelten Transportes liefern jeweils eine Gleichung für die markierte (s) und die unmarkierte (r) Methylglucose (28).

$$\begin{aligned} < 3.6 > \quad \frac{ds_i}{dt} = V_{\max} \frac{s_e}{s_e + r_e + K_T} - \frac{s_i}{s_i + r_i + K_T} & \text{für die markierte} \\ < 3.6a > \quad \frac{dr_i}{dt} = V_{\max} \frac{r_e}{s_e + r_e + K_T} - \frac{r_i}{s_i + r_i + K_T} & \text{für die unmarkierte} \end{aligned} \quad \left. \vphantom{\begin{aligned} < 3.6 > \quad \frac{ds_i}{dt} = V_{\max} \frac{s_e}{s_e + r_e + K_T} - \frac{s_i}{s_i + r_i + K_T} \\ < 3.6a > \quad \frac{dr_i}{dt} = V_{\max} \frac{r_e}{s_e + r_e + K_T} - \frac{r_i}{s_i + r_i + K_T} \right\} \text{MG}$$

Die charakteristischen Eigenschaften dieses vereinfachten Modells seien hier noch einmal kurz zusammengefaßt:

- sättigbare Transportkinetik mit den Parametern K_T u. $V_{\max}$
- Rate wird durch den transmembranären Transport bestimmt, d.h. die Bindung an den Carrier sehr viel schneller und wird hier als ständig im Gleichgewicht befindlich betrachtet.
- externe und interne Carrierkonzentration ändern sich während des Vorganges nicht, $V_{\max}$ bleibt konstant.

Die beiden gekoppelten Differentialgleichungen sind nicht analytisch lösbar, sondern wurden durch Umwandlung in Differenzengleichungen numerisch gelöst. ($V_{\max}$ und K_T wurden Abschn. 3.1 entnommen). Der Vergleich von Theorie und Experiment geht direkt aus

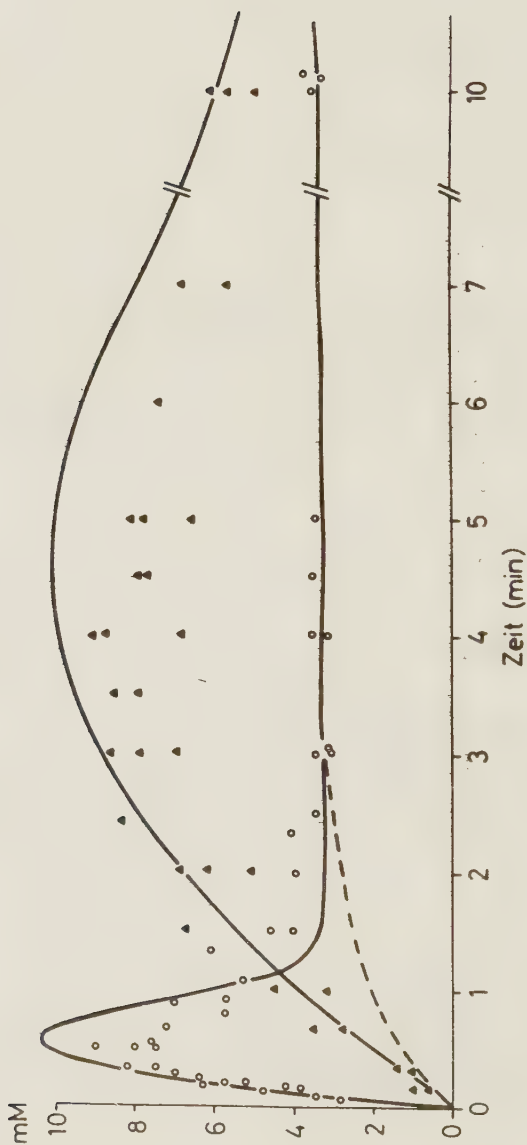


Abb. 3.5 Gegentransport:
Experimentelle Einstromwerte für markierte 3-O-MG in mit 55 mM 3-O-MG vorgeladene Zellen ohne(Δ) und mit($\circ$) Anwesenheit von 100 μ E/ml Insulin. Einzelwerte aus 2 - 3 verschiedenen Zellpräparationen. Durchgezogene Linien: Nach Gl. 3.5 numerisch berechnete Kurven mit den Parametern $K_T=6,6$ mM, $V_{max}=0,22$ mM/sec (basal) u. 1,8 mM/sec (Insulin). Gestrichelte Linie: Einstrom in unbeladene Kontrollzellen (ohne Insulin).

Abb. 3.5 hervor: Die Zeitpunkte für das Erreichen des Gegentransportmaximums werden von der Theorie recht gut vorhergesagt und liegen für insulinbehandelte Zellen bei 30-35 sec, während ohne Insulin bei etwa 4 min der höchste Wert erreicht wird. Die theoretischen Kurven durchlaufen ein Maximum von etwa dem 3-fachen des Gleichgewichtswertes, was von den experimentellen Werten nicht ganz erreicht wird. Der Grund dafür kann einerseits in einer nicht ganz starren Energiekopplung liegen, andererseits in den vom Modell nicht erfaßten Eigenschaften des Systems wie: unterschiedliche Permeabilität der Membran für beladenen und unbeladenen Carrier, oder die Carrierbindungskinetik wird Raten-bestimmend. Unter der Annahme, daß durch Insulin nur $V_{\max}$ vervielfacht wird, läßt sich aus dem Verhältnis der zeitlichen Lage der Maxima das Verhältnis der Maximalgeschwindigkeiten bestimmen, ohne die exakte Lösung zu kennen. Dies begründet sich dadurch, daß aufgrund der Linearität in $V_{\max}$ lediglich das Produkt $V_{\max} \cdot t$ eine Rolle spielt. Da im vorliegenden Fall ohne Insulin das Maximum nach einer 7-8 fach längeren Zeit erreicht wird, muß auch eine 7-8 fache Stimulation von $V_{\max}$ stattgefunden haben.

Die hinreichend gute Übereinstimmung von Experiment und dem dazu berechneten Kurvenverlauf zeigt, daß man zu einer eindeutigen Interpretation des Gegentransportes kommen kann, wenn man das einfache Carriermodell zugrunde legt, mit der daraus resultierenden Grundgleichung, die auch beim Einwärtstransport in Abschnitt 3.1 Verwendung fand. Zudem ergibt sich über den Kurvenverlauf eine zusätzliche Möglichkeit, das Stimulationsverhältnis zu bestimmen.

3.4 Zeitverlauf der Aktivierung des Transports

Nach Zugabe von Insulin benötigen Adipozyten zunächst eine bestimmte Latenzzeit, bis ein deutlicher Anstieg der Transportrate resultiert. Bei Insulinkonzentrationen über 50 $\mu\text{E/ml}$ hat diese initiale Wirkungsverzögerung eine Dauer von ca. 40-50 sec und ist hier nicht mehr von der Insulindosis abhängig. Diese Latenzzeit repräsentiert vermutlich einen Post-Rezeptorschritt unbekannter Natur in der Kette der Signalübertragung (7,22,25).

Nach etwa 3 min ist der Transport vollständig stimuliert und somit eine etwa 8,6-fach höhere Transportrate erreicht, als sie unter Basalbedingungen vorliegt. (Abb 3.6)

Bei submaximalen Insulinkonzentrationen sind die initiale Latenzphase verlängert, die Anstiegssteilheit und Maximalrate verringert (Abb. 3.7). Auch kann hier keine genaue Abgrenzung zwischen Verzögerungsphase und Anstiegsphase mehr festgelegt werden. Die Hormonkonzentration für halbmaximale Stimulation war für verschiedene Zellpräparationen uneinheitlich und lag zwischen 15 und 25 $\mu\text{E/ml}$, während Ciaraldi (7) und Whitesell (62) Dosen von 10 bis 15 $\mu\text{E/ml}$ benötigten.

Bei der Suche nach der Natur der Latenzphase stellt sich die Frage, ob nicht ein Schwellenwertmechanismus wirksam wird, der die "second messenger" Hypothese untermauern würde. Wie in der Diskussion noch näher erläutert wird, sollte in einem solchen Fall die Verzögerungszeit verändert sein, wenn man submaximal stimulierte Zellen einer nachfolgenden Stimulation unterwirft. In Abb. 3.8 ist die 2. Phase eines solchen Experimentes für drei verschiedene Zellpräparationen dargestellt, die mit Dosen von 15-25 $\mu\text{E/ml}$ vorbehandelt wurden und somit eine auf die Hälfte des Maximalwertes erhöhte Transportrate aufwiesen. Bei unverändert erhaltener Latenzzeit ist nun eine verringerte Anstiegssteilheit gegenüber der Aktivierung vom Grundzustand aus zu beobachten.

Die Länge der Latenzzeit ist also nicht von dem Ausmaß der Vorstimulation mit submaximalen Insulindosen abhängig. Wie in der Diskussion noch genauer ausgeführt wird, kommt somit ein Schwellenwertmechanismus für die Entstehung der Latenzphase kaum in Frage.

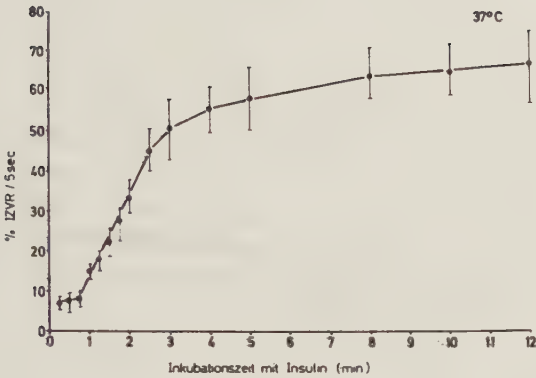


Abb. 3.6: Aktivierungskinetik des Glucosetransportsystems, 5 sec Einstromrate in % des intrazellulären Methylglucoseverteilungsraumes (IZVR) als Funktion der Inkubationszeit mit 100 μ E/ml Insulin. N = 7 Experimente $\pm$ Standardabweichung.

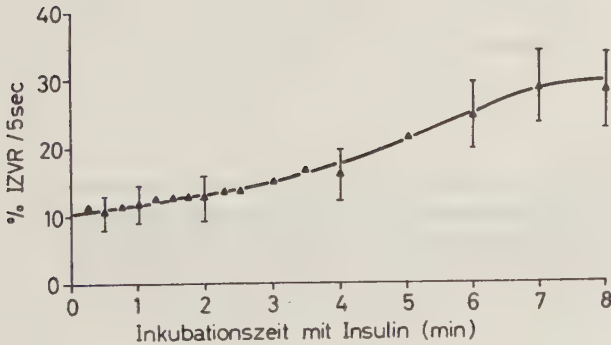


Abb. 3.7: Aktivierungskinetik des Glucosetransportsystems, 5 sec Einstromrate in % des IZVR als Funktion der Inkubationszeit mit 25 μ E/ml Insulin. N = 4 Experimente (Doppelwerte pro Experiment).

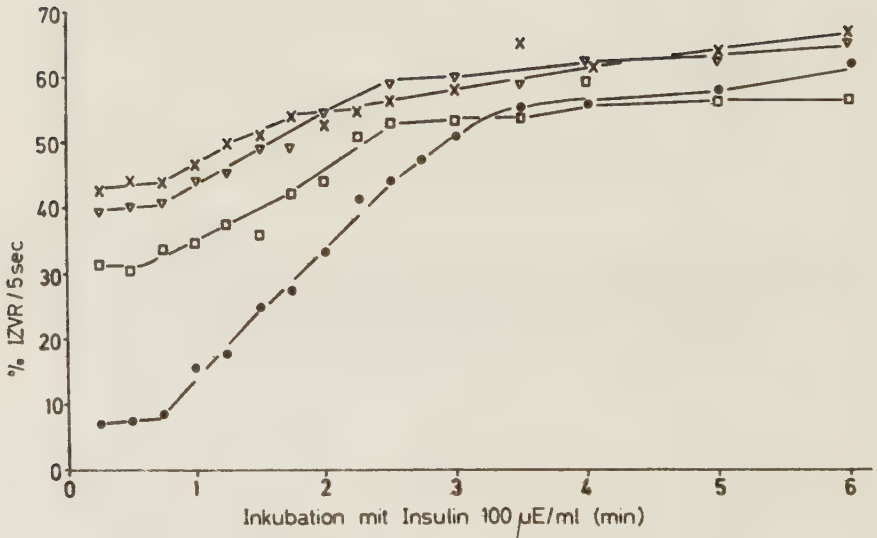


Abb. 3.8 : Aktivierungskinetik des Glucosetransportsystems, 5 sec Einstromrate in % des IZVR als Funktion der Inkubationszeit mit 100 µE/ml Insulin. (x, v, o) Drei verschiedene Zellpräparationen wurden zum Zeitpunkt $t = -10$ min mit 15 - 25 µE/ml Insulin vorinkubiert. (•) nicht vorinkubierte Kontrollzellen.

3.5 Temperaturabhängigkeit der Aktivierungsphase

Einen näheren Aufschluß über die Transmitterreaktion sollte die Temperaturabhängigkeit der Transportaktivierung erlauben, welche schon von Ciaraldi et al.(7) untersucht wurde. Dabei zeigte sich bei niedrigeren Temperaturen sowohl eine Verlängerung der initialen Zeitverzögerung, wie auch ein langsamerer Anstieg der Aktivierung. Diese Autoren sahen in der Latenzzeit eine charakteristische Zeitkonstante einer chemischen Reaktion, die umgekehrt proportional zur Transportgeschwindigkeit ist. Unter der Annahme, daß dies die Anfangsgeschwindigkeit der hypothetischen Transmitterreaktion ist, übertrugen sie diese in ein Arrhenius-Diagramm und fanden eine Linearität im gesamten Temperaturbereich. Aus der Steigung ergab sich eine Aktivierungsenergie von 25kcal/mol. Auf die Bedeutung eines linearen Verlaufs wird in der Diskussion und im Anhang 5.3.4 noch eingegangen.

In eigenen Messungen wurde die Dauer der initialen Verzögerungsphase für 6 verschiedene Temperaturen zwischen 10°C und 37°C bestimmt, und außerdem ein Zeitverlauf der Transportaktivierung bei 15°C ermittelt. Die Latenzphase hatte bei 15°C eine durchschnittliche Dauer von 4,5 min; die volle Aktivität war erst bei 20 min erreicht (Abb.3.9). Im Arrhenius-Diagramm ergibt sich im Temperaturintervall zwischen 10°C und 30°C ein linearer Kurvenverlauf; eine lineare Extrapolation hätte für 37°C einen Wert von 30 sec ergeben. Der tatsächlich gemessene Wert lag jedoch bei 45 sec, sodaß an dieser Stelle eine Nichtlinearität entstand. Aus der Geradensteigung konnten als Aktivierungsenergie 17,1 kcal/mol ermittelt werden, sowie ein Temperaturkoeffizient Q_{10} von ca. 2,5. Das System erwies sich auch bei einer Temperatur von 10°C noch aktivierbar, wenn auch mit einer anfänglichen Zeitverzögerung von etwa 8 min.

Die initiale Latenzzeit verlängert sich also bei niedrigen Temperaturen in thermodynamisch vorhersagbarer Weise. Die Tatsache, daß das System unter 15°C noch aktivierbar ist sowie das Abknicken der Arrheniuskurve bei etwa 30°C läßt Schlüsse über den Mechanismus der Kopplungsreaktion zu (sh. Abschn.5.3.4).

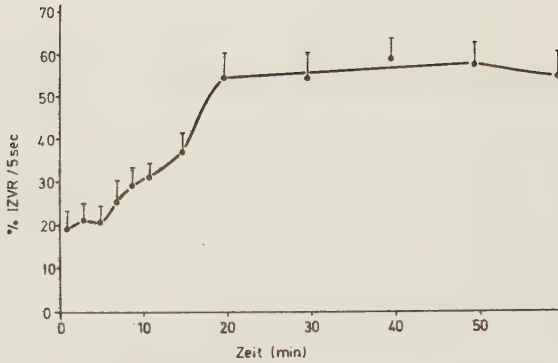
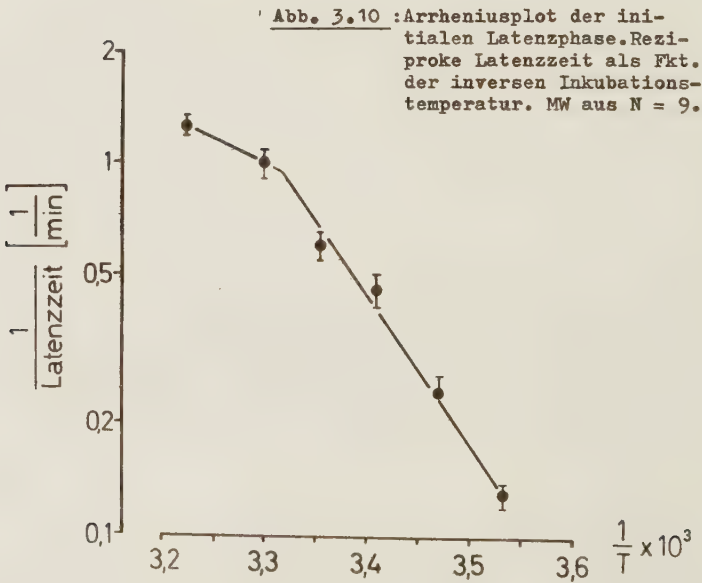


Abb. 3.9 : Kinetik der Aktivierung des Glucosetransportsystems bei 15°C. 45 sec Einstromrate in % des IZVR als Fkt. der Inkubationszeit mit 100 μ E/ml Insulin. N = 5 Experimente $\pm$ Standardabweichung.



3.6 Bindung und Transportaktivierung unter intrazellulärem ATP-Entzug

Die hemmende Wirkung von Atmungsketteninhibitoren auf die Stimulation des Transports wurde schon von Chandramouli(5) und Kono(36) beobachtet. Beide Autoren fanden, daß verschiedene Inhibitoren die Stimulationsfähigkeit des Transportsystems durch Insulin reversibel aufzuheben vermögen, während kein Einfluß auf die Basalrate erkennbar war. Sie schlossen, daß der intrazelluläre ATP Spiegel bei der Vermittlung des Insulinsignals auf den Transport eine entscheidende Rolle spielen könnte.

Welcher Schritt in der Kette der Übertragung des Hormonsignals ATP abhängig ist, konnte damit allerdings nicht geklärt werden. Ließe sich der zelluläre ATP Spiegel binnen kurzer Zeit senken, sodaß während der verschiedenen Phasen der Hormonwirkung der Effekt des akuten ATP Entzugs dargestellt werden könnte, so sollte dies interessante Aufschlüsse über Art und Lokalisation des ATP abhängigen Schrittes erlauben. Daher galt es zunächst zu prüfen, in welcher Zeit sich der intrazelluläre ATP Gehalt deutlich senken läßt. Weiterhin war von Interesse, wie sich eine submaximale Reduktion des ATP Spiegels auf die verschiedenen Phasen der Transportaktivierung auswirkt. Da die Hormon-Rezeptorbindung der Wirkung vorausgeht, mußte auch der Einfluß des ATP -Entzugs auf die Insulinbindung untersucht werden.

3.6.1 Wirkung von Atmungsketteninhibitoren auf den zellulären ATP-Spiegel

In dieser Arbeit wurden zwei Hemmstoffe benutzt, die prinzipiell die gleiche Wirkung auf den ATP-Gehalt von Zellen ausüben, sich im Angriffspunkt jedoch unterscheiden. Während Cyanid-Ionen den Elektronenfluß und somit die gesamte Atmung hemmen, führt Dinitrophenol zu einer Entkopplung von Elektronenfluß und Phosphorylierung bei erhaltener Atmung.

Abb.3.11 zeigt den Abfall des zellulären ATP-Spiegels in

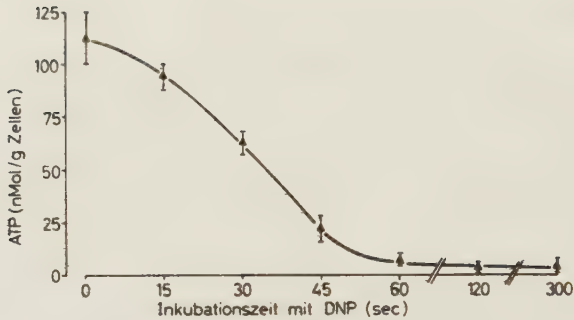


Abb. 3.11 : Intrazellulärer ATP-Spiegel in Adipozyten. Verlauf nach Zugabe von 1 mM p-Dinitrophenol zum Zeitpunkt $t = 0$. MW aus $N = 2$ Experimenten + Standardabweich..

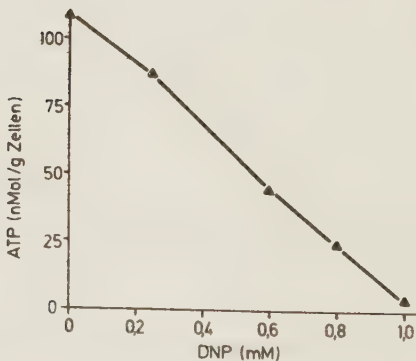


Abb. 3.12: Intrazellulärer ATP-Spiegel als Funktion der Dinitrophenolkonzentration im Inkubationsmedium nach 5 min Inkubation. $N = 2$ Experimente.

Abhängigkeit von der Zeit nach Zugabe von 1mM DNP zu einer Adipozytensuspension. Mit etwa der Halbwertszeit von 30sec fällt der ATP-Gehalt binnen einer Minute unter 10% des Ausgangswertes. Ebenso konnte durch 10mM KCN eine ATP-Reduktion nach einer Minute auf 15% des Ausgangswertes festgestellt werden. Abb.3.12 zeigt die ATP-Verminderung bei DNP-Konzentrationen zwischen 0 und 1mM. Es ergab sich ein fast linearer Zusammenhang mit einer 50% Reduktion bei etwa 0,5mM.

Chandramouli (5) konnte zeigen, daß nach Auswaschen des Inhibitors das zelluläre ATP regeneriert wird, und ebenso die ATP-verbrauchenden Prozesse wieder stattfinden. Somit war es möglich, eine sehr schnelle wie auch reversible Senkung des intrazellulären ATP zu erreichen, sodaß die zuvor beschriebene Voraussetzung für kinetische Messungen der Aktivierung als erfüllt betrachtet werden können.

3.6.2 Die Insulinbindung unter dem Einfluß von ATP-Entzug

Zur Lokalisation eines etwaigen ATP-abhängigen Schrittes in der Kette der Signalübertragung muß zunächst geprüft werden, ob eine Beeinflussung des ersten Gliedes der Kette, der Rezeptorbindung, stattfindet. Nach neueren Untersuchungen (24,43,49,54) wird ein Teil des zellulär gebundenen Insulins internalisiert. Bei Bindungsexperimenten geht in die Messung sowohl das plasmamembrangebundene als auch das internalisierte Insulin ein. Wird ein Einfluß bestimmter experimenteller Bedingungen auf die Bindung gefunden, so muß bei der Interpretation ein Einfluß auf beide Insulinfractionen in Betracht gezogen werden. Das Schicksal des vermutlich durch ATP-abhängige Endozytose in die Zelle gelangten Insulins besteht teilweise in einer lysosomalen Degradation, teilweise wird auch unzerstörtes Insulin ebenso wie die Abbauprodukte wieder nach außen geschleust. Das Verlassen der Zelle geschieht mit etwa derselben Zeitkonstante wie sie für die Dissoziation vom Rezeptor beobachtet wird.

In Abb.3.13A welche eine Bindungskinetik mit und ohne ATP-Reduktion darstellt, wird deutlich, daß der Bindungswert ATP-ver-

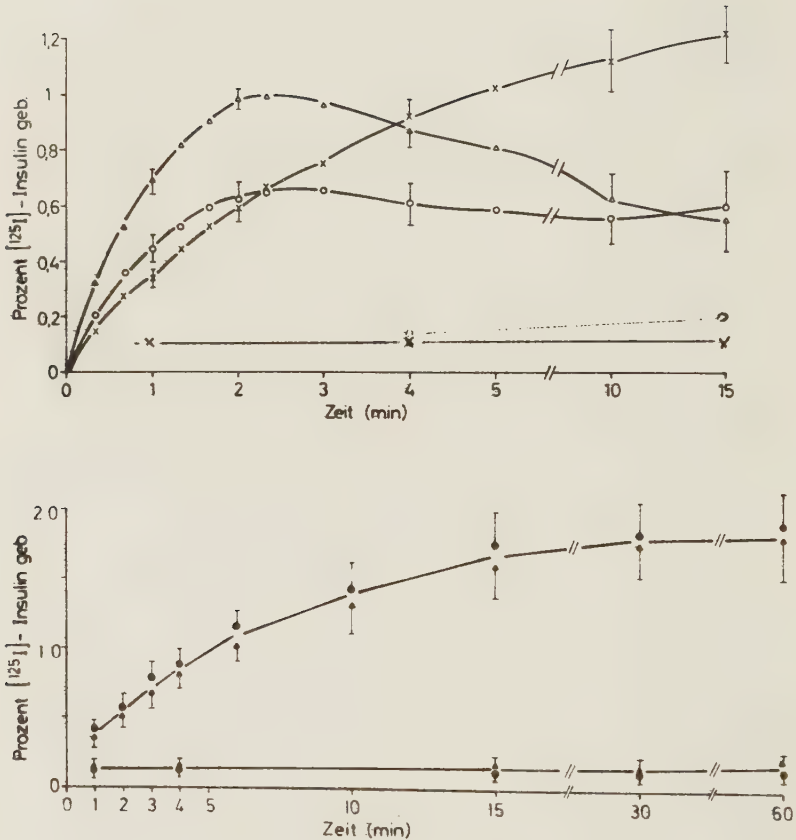


Abb. 3.13A (oben) und 3.13B (unten)

Insulinbindungskinetik unter ATP-Entzug. Gebundenes ^{125}J -Insulin in Prozent der freien Insulinkonzentration im Medium (100 $\mu\text{E/ml}$).

A.) 37°C : (x) Kontrollzellen (o), mit 1 mM DNP, (Δ) mit 10 mM KCN 5 min lang vorinkubierte Zellen.

B.) 15°C : (●) Kontrollzellen (▲) mit 1 mM DNP 5 min vorinkubierte Zellen

Die unteren Kurven entsprechen dem unspezifisch gebundenem Insulin. MW aus N=7 (KCN N=3) Experimenten $\pm$ Standardabweich..

armer Zellen im Gleichgewicht etwa nur 50% des Wertes normaler Kontrollzellen ist. Bei ungefähr 2min wird dieser Unterschied erstmals sichtbar. Die Halbwertszeit bis zum Erreichen des Gleichgewichtswertes betrug etwa 50-60 sec in Gegenwart von DNP oder KCN. Kaliumcyanid führt zu einer deutlich höheren initialen Assoziationsrate mit einer vorübergehenden Erhöhung über den Gleichgewichtswert hinaus, was zum gegenwärtigen Zeitpunkt nicht erklärt werden kann.

Die mit zwei verschiedenen Inhibitoren durchgeführte ATP-Reduktion in Fettzellen führte zu einer deutlich geringeren Bindung von Insulin an die Zelle. Dieser ATP-abhängige Unterschied im Gleichgewicht, der von anderen Autoren nicht gefunden wurde(51), muß mit dem internalisierten Anteil in Zusammenhang gebracht werden.

Bei 15°C ist diese Differenz weitgehend verschwunden (Abb. 3.13B). Diese Beobachtung ließe sich dadurch erklären, daß der physikalische Zustand der Plasmamembran bei dieser Temperatur keine Internalisierung durch Endozytose mehr zuläßt. (52)

3.6.3 Bestimmung der Hormonaktivierung des Glucosetransports unter ATP-Reduktion

a) Submaximale Reduktion

Wie in Abschnitt 3.3.1 dargestellt ist, kann der intrazelluläre ATP-Spiegel durch submaximale Inhibitorkonzentrationen nur teilweise reduziert werden. Eine Vorinkubation von 5 min mit 2mM KCN oder 0,7mM DNP senkt den ATP-Gehalt auf etwa 30% des Ausgangswertes. Unter diesen Bedingungen ergibt sich, wie in Abb. 3.14 gezeigt, eine reduzierte Aktivierungsgeschwindigkeit; es wird jedoch zu einem späteren Zeitpunkt die gleiche maximale Transportrate wie in den Kontrollzellen erreicht.

b) Maximale Reduktion

Mit Inhibitorkonzentrationen von 1mM DNP und 10mM KCN läßt sich der intrazelluläre ATP-Spiegel binnen einer Minute fast vollständig senken. Der Verlauf der Transportaktivierung durch Insulin-

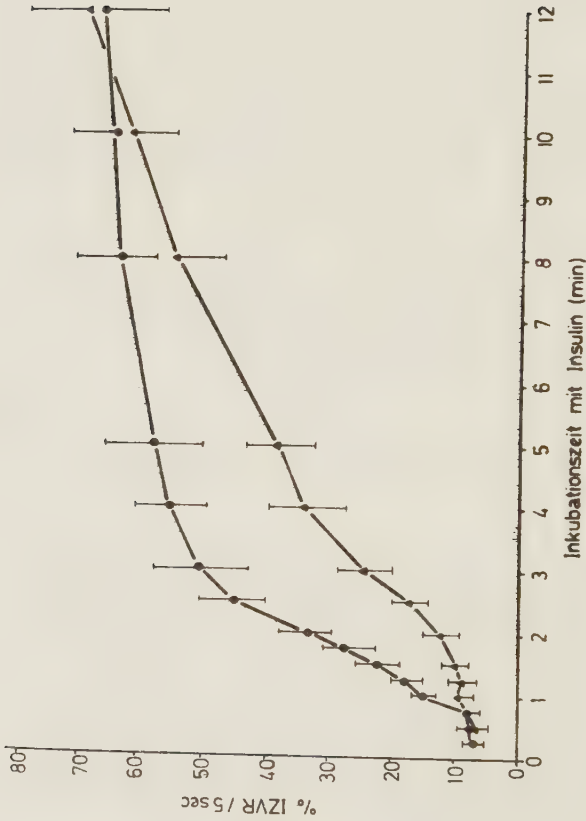


Abb. 3.14: Aktivierungskinetik mit submaximaler ATP-Reduktion. 5 sec Einstromrate als Funktion der Inkubationszeit mit 100 uE/ml Insulin. (●) Kontrollzellen ohne Inhibitor, (▲) mit 2 mM Kaliumzyanid 5 min vorinkubierte Zellen. MW aus N = 5 Experimenten $\pm$ Standardabweichung.

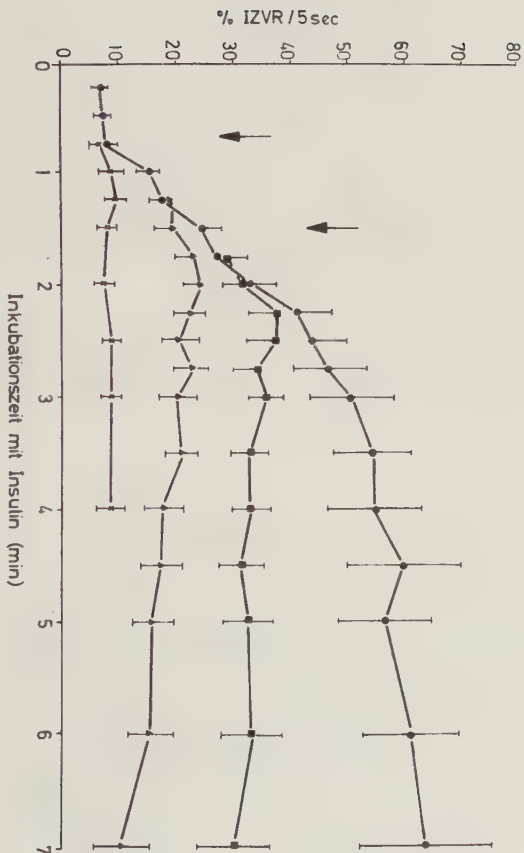


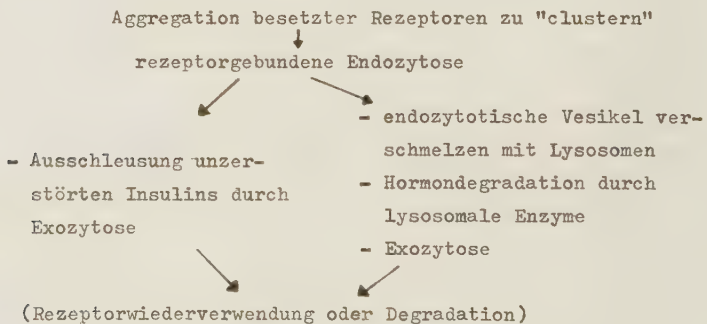
Abb. 3.15 : Kinetik der Aktivierung des Glucosetransportsystems. 5 sec Einstromrate von 3-O-MG als Funktion der Inkubationszeit mit 100 µE/ml Insulin. Zugabe von 1mM DNP bei -30 sec (x), 40 sec (▲), 90 sec (■), und kein Inhibitor (○). MW aus N=6 Experimenten ± Standardabweichung.

zugabe bei $t=0$ und bei einer Inhibitorzugabe zu den Zeitpunkten $t=0,=40$ und $=120$ sec ist in Abb. 3.15 aufgetragen. Nach Zugabe des Inhibitors wird innerhalb der Zeit, in der die ATP-Abnahme stattfindet, die weitere Transportaktivierung auf dem bis zu diesem Zeitpunkt erreichten Niveau gestoppt. Es erfolgt keine Insulinantwort, wenn der Inhibitor vor oder zusammen mit dem Insulin zugefügt wird. Andererseits hat der Inhibitor keinen Einfluß auf die Aktivität, wird er nach Erreichen des Gleichgewichtes (ca. 4 min) zugesetzt, was aus Gründen der Übersichtlichkeit hier nicht dargestellt ist. In einem Kontrollexperiment konnte gezeigt werden, daß der Effekt von DNP und KCN reversibel ist, d.h. daß nach Auswaschen des Inhibitors die normale Aktivierbarkeit der Fettzellen wieder erreicht werden kann.

ATP-Reduktion führt also zu einem sofortigen Stopp der Weiterleitung des Insulinsignals, ohne daß die Insulinwirkung durch Desaktivierung des Systems wieder gänzlich aufgehoben würde.

3.7 Insulinbindung unter Chloroquineinfluß

Wie in Abschnitt 3.6.2 schon erwähnt, wurde in neueren Arbeiten gezeigt, daß auch in Fettzellen Insulin internalisiert wird. (43,54) Der wahrscheinlichste Weg hierfür ist im Folgenden dargestellt:



Der lysosomale Abbau läßt sich durch Chloroquin und Ammoniumchlorid hemmen (27,35,43). Dies führt dazu, daß ein Teil des internalisierten Insulins nicht mehr ausgeschleust werden kann und in der Zelle verbleibt. Um eine mögliche Verbindung der Internalisierung zur Wirkung auf den Glucosetransport herstellen zu können, sollte Kinetik und Temperaturabhängigkeit dieser irreversiblen Aufnahme in Chloroquin-behandelte Zellen untersucht werden.

Dazu wurden Fettzellen zunächst nach 2.4 für eine definierte Zeit mit markiertem Insulin (100µE/ml) inkubiert. Dann wurde die Dissoziation durch Zugabe von überschüssigem Insulin (1E/ml) eingeleitet und über 30min verfolgt. Wie Abb. 3.16 zeigt, ist diese Zeitspanne bei allen Assoziationszeiten zwischen 20sec und 15min ausreichend, um alles spezifisch gebundene ¹²⁵I-Insulin vom Rezeptor zu entfernen. Bei den Zellen, die mit Chloroquin (250µM, als Hydrochlorid) vorbehandelt wurden, war im Gegensatz dazu bei höheren Assoziationszeiten nach Ablauf der 30 Minuten noch ein irreversibel gebundener Anteil erkennbar. Dieser undissoziierbare Teil wurde erst bei Assoziationszeiten von mehr als einer Minute nachweisbar und muß als internalisiertes und im Abbau gehemmtes Insulin angesehen werden.

Will man ausgehend hiervon zu einem Verständnis der Zeitabläufe bei der Internalisierung gelangen, so muß berücksichtigt werden, daß für die Internalisierung nicht nur die Assoziationszeit allein, sondern die gesamte Rezeptorbesetzungszeit (Assoziations- plus Dissoziationszeit) maßgebend ist. Bei der kritischen Assoziationszeit von 1 min beträgt die gesamte Rezeptorbesetzungszeit (Abb. 3.16) etwa 3 min, da zusätzlich noch etwa 2 min für die Dissoziation benötigt werden. Dies Ergebnis zeigt, daß eine Mindestassoziationszeit von etwa einer Minute (und damit einer Rezeptorbesetzungszeit von 2-3 min) einer Einschleusung des Insulins in den Chloroquin-hemmbar lysosomalen Abbauweg vorausgehen muß.

Einige Autoren konnten die Akkumulation des irreversibel gebundenen Insulins als vermehrte Bindung unter Chloroquineinfluß nachweisen (27,35,43). Dieses Ergebnis konnte in einem Versuch, der in Abb. 3.17 dargestellt ist, bestätigt werden.

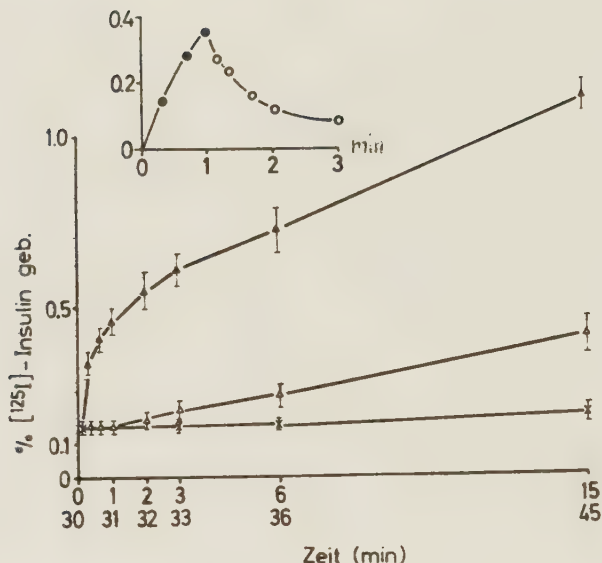


Abb. 3.16: Reversibilität der Bindung nach Zugabe von 100 $\mu\text{E/ml}$ Insulin. Kleines Bild: Normales Assoziations-(bis 1min) und Dissoziationsverhalten von unbehandelten Zellen. Gr. Bild: (▲) Assoziation nach Vorinkubation mit Chloroquin (250 $\mu\text{E/ml}$) für 20 min. Maßgebend ist die obere Zeitskala 0 - 15 min. Nach Assoziation für die Zeiten der oberen Skala wurde die Dissoziation mit 1 E/ml unmarkiertem Insulin eingeleitet und der Dissoziationsprozess nach weiteren 30 min beendet (untere Zeitskala). Verbleibende zellgebundene Insulinmenge bei (x) nicht Chloroquin-vorbehandelten Kontrollzellen, bei (Δ) mit 250 $\mu\text{E/ml}$ Chloroquin-HCl behandelten Zellen.
MW aus N = 6 Experimenten $\pm$ Standardabweichung

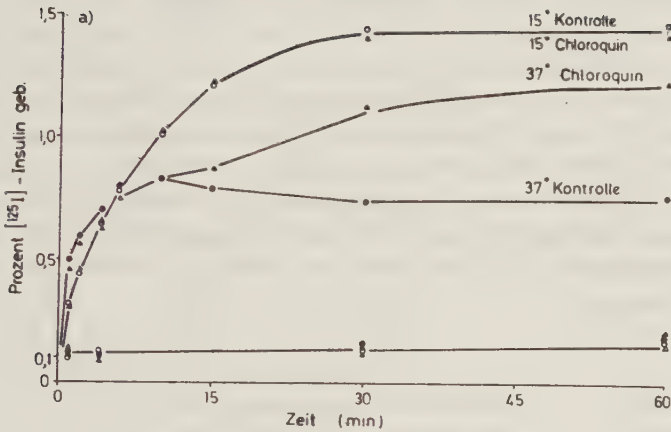


Abb. 3.17 : Bindungskinetik von $[^{125}\text{I}]$ -Insulin (100 $\mu\text{E/ml}$) an mit 250 $\mu\text{E/ml}$ Chloroquin behandelte Fettzellen und an Kontrollzellen bei 37°C und bei 15°C. Untere Kurve : unspezifisch gebundenes Insulin. MW aus N = 4 Experimenten

Unter Normalbedingungen akkumulierte Insulin in mit Chloroquin vorbehandelten Zellen über den Gleichgewichtswert der Bindung hinaus. Schon nach relativ kurzer Zeit stellte sich ein Gleichgewicht ein, sodaß etwa doppelt so viel ^{125}J -Aktivität an Chloroquin-vorbehandelten Zellen nachzuweisen war wie an Kontrollzellen. Im Gegensatz dazu wurde von einem der genannten Autoren zwar eine vermehrte Akkumulation aber keine Gleichgewichtseinstellung gefunden (35)!

Bei 15°C war der Chloroquin-bedingte Unterschied kaum noch erkennbar. Das kann einerseits damit erklärt werden, daß Chloroquin als Hemmsubstanz bei dieser Temperatur nicht mehr wirksam ist, wahrscheinlicher ist jedoch, daß bei 15°C kaum mehr Insulin in den lysosomalen Abbauweg hineingeschleust wird. Letzteres konnte schon bei ATP-verarmten Fettzellen damit erklärt werden, daß bei 15°C eine Internalisierung weitgehend aufgehoben ist, da bei dieser Temperatur keine Endozytoseaktivität mehr vorhanden ist.

Die Versuche bestätigen also das Konzept der Internalisierung und des lysosomalen Abbaus von Insulin. Der Beginn der Internalisierung folgt dem Beginn der Bindung im Abstand von ca. 2 - 3 Minuten.

3.8 Die Rolle des Calciums bei der Insulinwirkung

Bei der Suche nach einem "second messenger", der die Vermittlung des Insulinsignals mit übernimmt, wurde auch Calcium in die Untersuchungen mit einbezogen (8,14).

Am Muskel konnte eine Erhöhung des intrazellulären Ca^{++} -Spiegels durch Insulin beobachtet werden; als Quelle kam die Innenschicht der Plasmamembran in Frage. Ebenso wurde eine Hemmung der membranständigen Ca^{++} -ATPase durch Insulin diskutiert. Auch an epididymalem Fettgewebe wurde eine insulininduzierte Steigerung der Calciumionen beobachtet (8). Über eine Verbindung dieses Phänomens zum Glucosetransport konnten bisher nur indirekte Aussagen gemacht werden.

Die Zugabe des Chelatbildners EDTA zum Inkubationsmedium führt

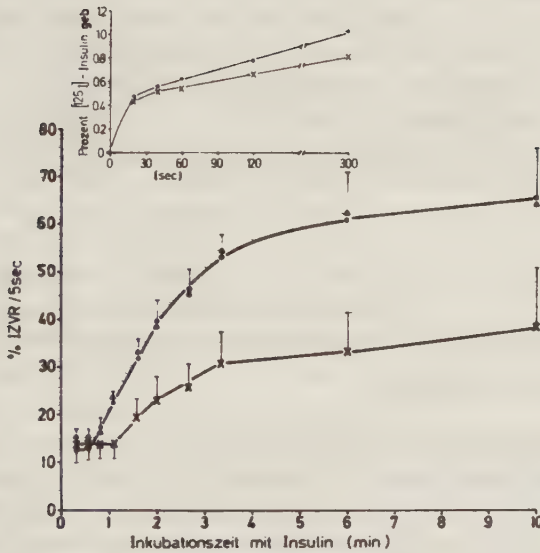


Abb. 3.18 : Verlauf der Aktivierung des Glucosetransports und der Bindung (oberes Bild) unter EDTA-Wirkung. 5 sec Einstromrate von 3-O-MG als Funktion der Inkubationszeit mit Insulin (100 μ E/ml). (x) 5 min mit 5 mM EDTA vorinkubierte Zellen, Kontrollzellen (●), 5 min mit Calciumchlorid (10 mM) und EDTA (5 mM) vorinkubierte Zellen (▲). MW aus N = 6 (x, ●), bzw. N = 3 (▲) Experimenten + Standardabweichung

zu einer sofortigen Bindung der freien Ca^{++} -Ionen. Abb. 3.18 zeigt, daß die Ca^{++} -Reduktion durch EDTA (5mM) keinen Einfluß auf die anfängliche Insulinbindung hat. Jedoch war unter gleichen Bedingungen ein merklicher Einfluß auf die Transportaktivierung zu erkennen. Die initiale Latenzphase war verlängert, die Aktivierungsgeschwindigkeit etwa um 50% geringer, und die maximale Transportrate war deutlich niedriger. Dieser Effekt konnte durch Zugabe von 10mM Calciumchlorid, nicht jedoch durch Magnesiumchlorid vollständig aufgehoben werden (Abb. 3.18).

Damit konnte eine reversible wie auch Ca^{++} -spezifische hemmende Wirkung des EDTA auf die Transportaktivierung gezeigt werden.

3.9 Stimulation des Glucosetransports bei verminderter Rezeptorendichte

Mit optischen Methoden konnte gezeigt werden, daß Rezeptoren in der Plasmamembran lateral diffundieren können. Ausgehend von der Vorstellung, daß bei der Transmitterreaktion dieser Vorgang eine Rolle spielen könnte, ist zu erwarten, daß eine rezeptordichteabhängige Diffusionsstrecke zwischen benachbarten Rezeptoren die Geschwindigkeit der Transmitterreaktion mitbestimmen würde. Daher wurde die Stimulierungsreaktion an Zellen mit verminderter Rezeptorendichte, wie sie bei hyperinsulinämischen Tieren auftritt, durchgeführt.

Nach einer von Kobayaschi et al. (34) ausgearbeiteten Methode wurde in 100 gr schweren Ratten durch subkutane Insulininjektionen ein Zustand von Hyperinsulinismus erzeugt. Es ist bekannt, daß dies zu einer Herabregulation der membranständigen Insulinrezeptoren an der Effektorzelle führt. Nach dem unten gezeigten Plan wurde eine Hälfte der Tiere 15 Tage lang durch Injektionen in 12 stündigem Abstand mit aufsteigenden Insulindosen behandelt; die 2. Hälfte wurde als Kontrollreihe mit NaCl-Lösung gespritzt.

1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.	11.	12.	13.	14.	15.	Tag
2x 0,25E	2x 0,75E	2x 0,75E	2x 1E	2x 1,5E	2x 1,5E	2x 2E	2x 2E	2x 2,5E	2x 2,5E	2x 3E	2x 3E	2x 3E	2x 3,5E	2x 3,5E	Depot insulin CS Hoe.

Die Tiere hatten nach Ablauf der Zeit ein Gewicht zwischen 190 und 210 gr (kein Unterschied zur Kontrollreihe und einen Gesamtlipidgehalt von $12,5 \pm 1,5$ mg/ 10^5 Zellen (Kontr. $10,7 \pm 0,6$ mg/ 10^5 Z))

Zur Ermittlung des Erfolges bzw. des Ausmaßes der "Herunter-Regulation" wurde ein Scatchard-Plot angefertigt, in welchem sich die maximale Bindungskapazität als Gesamt-rezeptorendichte darstellt. Es zeigte sich (Abb. 3.19), daß ein signifikanter Unterschied zwischen den insulinbehandelten und den un-behandelten Tieren bestand:

Die maximale Bindungskapazität änderte sich etwa um den Faktor $2/3$, und eine Rezeptorendichte von

$2,4 \cdot 10^5$ /Zelle bei Hyperinsulinämie

$3,6 \cdot 10^5$ /Zelle bei Normaltieren

ließ sich errechnen.

Es wurde eine Kinetik der Transportstimulation für maximale ($100 \mu\text{E/ml}$) und submaximale ($25 \mu\text{E/ml}$) Insulindosen aufgenommen. Zunächst wird aus den Kurven deutlich, daß sich Basalraten und stimulierte Raten zwischen beiden Gruppen kaum unterschieden, was auch von Kobayaschi (34) beobachtet wurde. Die Zellen mit verminderter Rezeptorendichte scheinen zwar eine leichte Ver-zögerung in ihrem Aktivierungsverhalten zu zeigen, dieser Effekt ist jedoch statistisch nicht signifikant (Abb. 3.20).

Aus dem Lipidgehalt der beiden verschiedenen Zellgruppen läßt sich unter der einfachen Annahme, daß ein vermehrter Lipid-gehalt zu einem erhöhten Zellvolumen führt, die Oberflächendif-ferenz berechnen. Die Oberfläche der Zellen der hyperinsulin-ämischen Tiere war um etwa 7% größer als bei den Kontrollzellen, was die oben berechnete Differenz der Rezeptorendichte noch ver-größert. Die Oberflächendichte der Rezeptoren scheint also kein maßgeblicher Faktor für den die Latenz- und Aktivierungsphase bestimmenden Kopplungsschritt zu sein.

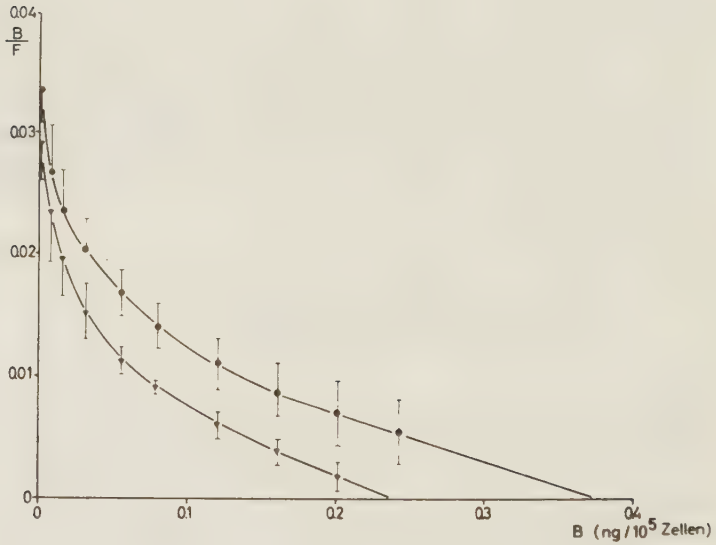


Abb. 3.19 : Scatchard-Diagramm der Bindung von [^{125}J]Insulin an hyperinsulinämische (▼) und Kontrollzellen (●).
MW aus $N = 4$ Experimenten $\pm$ Standardabweichung.
(B = zellgebundene, F = freie Insulinkonzentration)

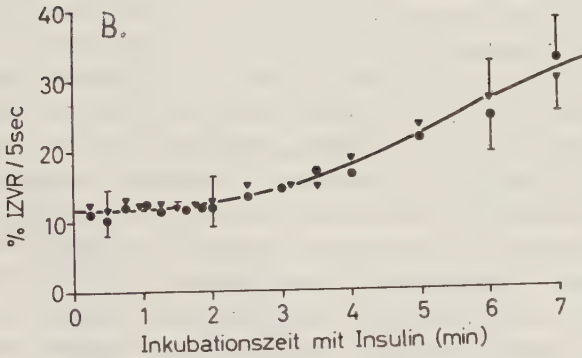
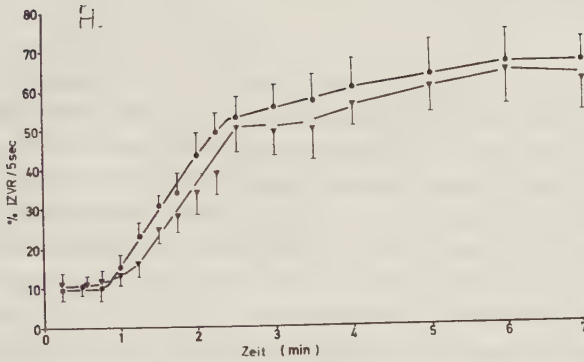


Abb. 3.20 : Verlauf der Aktivierung des Glucosetransportsystems bei Hyperinsulinämie. 5 sec Einstromrate von 3-O-MG als Funktion der Inkubationszeit mit 100 µE/ml Insulin(A). Kontrollzellen (•), Zellen bei Hyperinsulinämie (▼). B.) dto. bei 25 µE/ml Insulin. MW aus N = 5 Experimenten $\pm$ Standardabweichung.

4. D I S K U S S I O N

Die Bindung von Insulin an den Rezeptor in der Plasmamembran der Fettzelle führt zur Aktivierung des Glucosetransportsystems. Die Folge ist ein vermehrter Einstrom von Glucose ins Zytoplasma. Wie in der Einleitung dargelegt, hat die Beobachtung einer initialen Latenzphase in der Kinetik der Aktivierung des Transports zu der Hypothese geführt, daß zwischen dem ersten Schritt in der Insulinwirkung, nämlich der Bindung an den Rezeptor, und dem letzten Schritt, der Aktivierung des Transports, noch ein oder mehrere signalübertragende Mechanismen zwischengeschaltet sein müssen. Während andere Arbeitsgruppen versuchen, durch Isolierung des Rezeptors und des Transportsystems und durch Rekombination dieser Bausteine in künstliche Membranen die Signalübertragung aufzuklären, wurden hier experimentelle Möglichkeiten erarbeitet, das System an der intakten Zelle zu charakterisieren. Ausgangspunkt dieser Arbeit war die Hypothese, daß die Latenzphase einen Schritt der Transmitterreaktion reflektiert, und daß Modifikationen der Latenzphase und der Aktivierungskinetik Rückschlüsse auf den der Signaltransmission zu Grunde liegenden Mechanismus erlauben. Mit dieser Methode wurde bisher gefunden, daß die Transmitterreaktion temperaturabhängig ist (7), ein intaktes mikrotubuläres System benötigt (26) und bei niedrigen Insulinkonzentrationen verlangsamt abläuft (25).

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluß von Atmungsketteninhibitoren, von Hemmern des lysosomalen Abbaus in der Zelle, von Calcium-bindenden Substanzen und von Änderungen der Rezeptorendichte untersucht und eine genaue Analyse der Temperaturabhängigkeit der Kopplungsreaktion vorgenommen.

Bevor die eigentliche Transmitterreaktion diskutiert werden soll, sollen zunächst die experimentell zugänglichen Schritte bei der Insulinwirkung, nämlich die Insulinbindung an die Fettzelle und das Glucosetransportsystem, untersucht werden.

4.1 Das Glucosetransportsystem

Das Glucosetransportsystem läßt sich unter Verwendung von ^{14}C -markierter 3-O-Methyl(D)glucose sehr gut isoliert experimentell erfassen, ohne daß eine nachfolgende Metabolisierung oder eine parallellaufende Diffusion dieses Zuckers störend wirken. Durch das von Whitesell und Gliemann entwickelte schnelle Meßverfahren (62) sind auch Änderungen darstellbar, die nur Sekunden in Anspruch nehmen.

Die Ergebnisse der Messungen (Abb. 3.1-3.3) zeigen, daß sich die Einstromvorgänge hinreichend genau mit einer Sättigungskinetik beschreiben lassen, wobei die beiden charakteristischen Transportparameter $V_{\max}$ und K_T bestimmt werden können. Die Affinität K_T zum Transportsystem betrug etwa 6,6 mM und änderte sich durch Hormonstimulation kaum. Die maximale Transportgeschwindigkeit $V_{\max}$ wird durch Insulin ca. 8,5 fach vergrößert. Der vermehrte Einstrom von Methylglucose wird also nicht durch eine Erhöhung der Affinität zum Carrier gesteuert. In den meisten früheren Arbeiten¹⁾ wurden Michaeliskonstanten zwischen 2 und 8 mM gefunden, die insulinunabhängig waren. Am besten stimmt die hier berechnete K_T mit derjenigen von Siegel (51) gemessenen überein. In der Literatur angegebene Einstromraten und Stimulationsverhältnisse waren unterschiedlich und die Raten niedriger als die in dieser Arbeit gemessenen. In den eigenen Experimenten ergaben sich Halbwertszeiten der Einstromkinetik von 3,5 sec mit und 20 sec ohne Insulin (Substratkonz. $\ll K_T$), was am ehesten mit den Messungen von Whitesell u. Gliemann sowie Siegel u. Olefski, die kurze Meßzeiten benutzten, übereinstimmt. (Vgl. Tab. 3.2 u. Anhang 5.2) Die höheren Raten in dieser Arbeit lassen sich damit erklären, daß zum erstenmal mathematische Extrapolationsverfahren benutzt wurden, welche die experimentelle Schwierigkeit umgingen, die Anfangsgeschwindigkeit durch kürzeste Messzeiten zu ermitteln. Es läßt sich daher vermuten, daß bisher

¹⁾ Anmerkung: Eine genaue Aufstellung über Transportparameter früherer Arbeiten findet sich im Anhang.

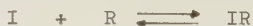
zu niedrige Raten angenommen wurden.

Die Tatsache, daß Insulin zwar $V_{\max}$, nicht aber die Affinität zum Transportsystem ändert, deutet darauf hin, daß entweder die Transportgeschwindigkeit vorhandener Carrier erhöht wird oder aber neue Transporteinheiten bereitgestellt werden. Thermodynamische Überlegungen (45) sprachen sehr für letzteren Mechanismus, obwohl von Czech ein Modell diskutiert wurde, bei dem sich die Carrierzahl in der Membran zwar lokal, aber nicht insgesamt ändert (14). In zwei neueren Arbeiten konnte nun auch gezeigt werden, daß unter Insulin neue Transporteinheiten aus intrazellulären Organellen in die Membran transloziert werden (10,55).

Zur weiteren Charakterisierung des Glucosetransports lassen sich die Beobachtung von Gegentransportphänomenen in dieser Arbeit heranziehen. Hier wurde nach unserem Wissen diese Erscheinung unter dem Einfluß von Insulin wie auch unter beschleunigtem Einwärtstransport erstmalig untersucht; letzteres liefert eindeutigere Ergebnisse, da auf Grund osmotischer Begleiteffekte beim beschleunigten Auswärtstransport Fehlinterpretationen möglich sind (37). Diese Versuche mit vorgeladenen Zellen zeigten einen temporären "quasi-aktiven" Transport, der sich mathematisch hinreichend gut mit den Gleichungen für einen Carriermechanismus beschreiben ließ (Abb. 3.5). Prinzipiell könnten auch selektive Poren einer Sättigungskinetik unterliegen, jedoch kann nur ein Carrier eine Kopplung von zwei Strömen durch die Membran in Gegenrichtung aufrecht erhalten. Dies gilt insbesondere dann, wenn eine über das Gleichgewicht hinausgehende Konzentrierung der aufgenommenen Glucose erfolgt.

4.2 Die Insulinbindung und das Konzept der Internalisierung

Die Bindung von Insulin an den hormonspezifischen Rezeptor der Fettzelle kann näherungsweise als Reaktion 1. Ordnung beschrieben werden:



Bis vor einiger Zeit galt das an den Rezeptor in der Plasmamembran gebundene Insulin als einzige zellständige Fraktion. Durch neuere Untersuchungen, die im Folgenden kurz skizziert werden sollen, wurde, wie schon in Kap. 3 erwähnt, eine zusätzliche intrazellulär lokalisierte Fraktion entdeckt und daher die Aufnahme von Rezeptor-gebundenem Insulin in die Zelle postuliert. Da sich dieser internalisierte Anteil kinetisch ähnlich verhält wie der Rezeptor-gebundene Teil, konnte er durch Bindungsstudien lange nicht nachgewiesen werden. Erste Hinweise auf eine Internalisierung gaben daher elektronenoptische Befunde an Hepatozyten, Lymphozyten und Fibroblasten (24,31,49). Schlessinger et al. konnten mit Hilfe von Fluoreszenztechniken zeigen, daß einer ATP-abhängigen Internalisierung zunächst eine energieunabhängige Formierung von "patches" vorausgeht, einem Zusammendrängen von besetzten Rezeptoren zu internalisierbaren Komplexen. In jüngerer Zeit wurden auch an Fettzellen Beweise für eine energieabhängige Internalisierung gefunden. Durch Fraktionierung des zellgebundenen ^{125}J im Dichtegradienten konnte gezeigt werden, daß zwei Insulinfraktionen dominieren (36,54):

- 1.) Eine zuerst entstehende, aus intaktem Insulin bestehende Fraktion, die das am Oberflächenrezeptor gebundene Insulin repräsentiert.
- 2.) Einen zweiten Anteil, der
 - zeitlich nach dem ersten auftritt
 - bei 15°C nicht mehr nachweisbar ist
 - unter ATP-Entzug nicht entsteht und im insulin-freien Medium in ATP-entleerten Zellen auch nicht verschwindet
 - in isolierten Zellhomogenaten nicht gebildet werden kann

Von diesem zweiten Anteil nahmen die Autoren an, daß es sich um internalisiertes Insulin handelt, und errechneten, daß etwa 12% des zellständigen Hormons intrazellulär degradiert wird.

Experimente, bei denen der lysosomale Abbau mit Chloroquin oder Ammoniumchlorid gehemmt wurde, haben bewiesen, daß diese internalisierte Fraktion in Lysosomen teilweise abgebaut wird,

und die Produkte wieder ausgeschleust werden. (27,43). Unter diesen Bedingungen wurde Insulin aus der intakten Zelle nicht mehr ausgeschleust und akkumulierte intrazellulär, wodurch erhöhte Bindungswerte gemessen wurden (Abb. 3.17).

Bei den eigenen Bindungsstudien fand sich eine erhöhte Gleichgewichtsbindung bei Kontrollzellen gegenüber derjenigen von ATP-verarmten Zellen (Abb. 3.13). Siegel und Olefski (51) fanden im Gegensatz dazu **die soeben beschriebene Differenz in der Bindung nicht**. Für diese Diskrepanz in den Ergebnissen haben wir derzeit keine Erklärung. Diese zusätzliche ^{125}J -Aktivität muß in Anlehnung an die erwähnten Untersuchungen von Kono mit internalisiertem Insulin und seinen Abbauprodukten erklärt werden.

Es ergibt sich die Frage, ob die hier gemessene, um 100 % erhöhte Bindung in Kontrollzellen gegenüber ATP-verarmten Zellen quantitativ mit dem internalisierten Anteil gleichgesetzt werden kann. Die Tatsache, daß bei der Internalisierung zugleich mit dem Hormon auch Rezeptoren in die Zelle mit aufgenommen werden (24), könnte durch eine Reduktion der Rezeptorzahl an der Zelloberfläche zu einer Verschiebung des dynamischen Gleichgewichtes und damit zu einer Änderung der Oberflächenbindung führen. Da jedoch bei den hier gewählten Versuchsbedingungen die Zahl der besetzten Rezeptoren klein ist gegenüber der Zahl der Gesamt Rezeptoren, dürfte eine solche Verschiebung quantitativ nicht ins Gewicht fallen.

Bei 15°C war diese Bindungsdifferenz nicht mehr nachweisbar. Diese Beobachtung stützt die These, daß diese Differenz durch Unterschiede in der Internalisierungsfähigkeit der Zellen zustande kommt. Nach derzeitiger Vorstellung erfolgt die Aufnahme von Insulin in die Zelle über eine Rezeptor-gebundene Endozytose. Es wird heute angenommen, daß Endozytose unterhalb einer kritischen Temperatur (18 - 20°C) zum Erliegen kommt (52). Dies scheint auch für die Aufnahme von Insulin zuzutreffen, wie sich aus den zuvor erwähnten Daten von Kono und Gordon ableiten läßt, welche bei diesen niedrigen Temperaturen kein Insulin mehr in der Zelle nachweisen konn-

ten. Da aber keineswegs bekannt ist, ob und welche (möglicherweise sehr kleine) Mengen von Insulin eine eventuell intrazellulär angreifende Stimulation des Transports bewerkstelligen könnten, sollten andere Mechanismen, die Proteine ins Zellinnere transportieren können, nicht ganz außer Acht gelassen werden. So fand z.B. Steinmann (53), der die Pinozytose an Fibroblasten mit Hilfe eines Markerproteins (Meerrettich-Peroxidase) untersuchte, einen linearen Arrhenius-Plot für die Internalisierung zwischen 2° und 38°C, ohne daß sich ein Phasenübergang zeigte. Postuliert man eine Insulinaufnahme über den gleichen Mechanismus, so sollte wegen der relativ hohen Aktivierungsenergie die Internalisierung bei 15°C etwa 6 - 8 mal geringer sein als bei 37°C, was sicherlich den Nachweis von internalisiertem Insulin bei dieser Temperatur erschwert.

Bei 37°C konnten die Versuche mit Chloroquin die zuvor erwähnten Experimente von Olefski und Jarret bestätigen. Chloroquin-vorbehandelte Zellen verminderten die Ausschleusung von Insulin und seinen Degradationsprodukten und führten durch Akkumulation zu einer um 100% erhöhten Bindung gegenüber Kontrollzellen (Abb.3.17). Bei 15°C war dieser Effekt verschwunden. Das kann einerseits dadurch erklärt werden, daß Chloroquin als Hemmsubstanz bei dieser Temperatur nicht mehr wirksam ist, viel wahrscheinlicher ist jedoch nach dem zuvor Gesagten, daß bei 15°C kaum mehr Insulin in den lysosomalen Abbauweg eingeschleust wird, da die Internalisierung aufgehoben ist.

Ein weiteres Experiment konnte zeigen (Abb.3.16), daß die hohe Bindung unter Chloroquineinfluß auf einen irreversibel gebundenen Anteil zurückzuführen ist, der nach Abdissoziation des oberflächlichen Insulins noch nachweisbar war. Der Zeitpunkt, zu dem dieser irreversible Anteil erstmals erscheint, liegt bei 2 - 3 Minuten. Unter der Annahme, daß immer ein bestimmter Teil des in die Zelle eintretenden Insulins über den Chloroquin hemmbaren lysosomalen Abbauweg geht, wäre hiermit ein zeitverzögerter Internalisierungsbeginn bewiesen.

Aus diesen Ergebnissen lassen sich bezüglich aller Insulinbindungsstudien, die in der vergangenen Zeit gemacht

wurden und in Zukunft gemacht werden, die folgenden wichtigen Schlußfolgerungen ableiten. Bisher wurde alles spezifisch an die Effektorzelle des Insulins gebundene Hormon als Bindung an den Oberflächenrezeptor angesehen und dies schlichtweg als Bindung bezeichnet. Daraus wurden wichtige Erkenntnisse über die Affinität des Insulins zum Rezeptor und die Gesamtrezeptorenzahl abgeleitet und u.a. die Existenz zweier verschiedener Rezeptortypen oder das Phänomen der negativen Kooperativität postuliert. Das Konzept der Internalisierung läßt diese Resultate jedoch in einem ganz neuen Licht erscheinen und verlangt ein Überdenken dieser Schlußfolgerungen, da sich gezeigt hat, daß, zumindest bei niedrigen Hormonkonzentrationen, nur etwa die Hälfte des Insulins oberflächlich an den Rezeptor gebunden ist. Möglicherweise wurde hier erstmals ein Weg aufgezeigt, die eigentliche Rezeptorbindung als solche darzustellen, indem die Internalisierung wie oben beschrieben unterbunden wurde. Damit könnte ein Mittel bereitgestellt sein, die Oberflächenbindung in Zukunft allein zu untersuchen und dem internalisierten Anteil gegenüberzustellen.

4.3 Kopplung von Bindung und Wirkung

Bei der Untersuchung des Kopplungsschrittes von Bindung und Wirkung sind wir von der Hypothese ausgegangen, daß die initiale Latenzphase einen unbekannten Transmitterschritt reflektiert. Die Latenzzeit hat nach Abb. 3.6 eine Dauer von ca. 40 - 50 Sekunden. Durch Absenken der Temperatur, eine teilweise Senkung des ATP-Gehaltes und durch Calciumionenerniedrigung konnte eine Verlängerung dieser Kopplungszeit erzielt werden. Die Veränderung der Oberflächendichte der Rezeptoren hatte keinen Einfluß auf die initiale Latenzzeit.

Nach dem im Anhang 5.3.1 dargelegten Modell für die Aktivierung neuer Transporteinheiten (Carrier) sollten diese einem Fließgleichgewicht unterliegen, dessen Niveau sich durch Insu-

linzugabe erhöhen läßt. Würde sich nach Zufügen von Insulin sofort die volle Carrierbildungsrate einstellen, so sollte sich die Aktivierung in einem monexponentiellen Anstieg zu erkennen geben, also einem unverzögerten Beginn. Die Existenz der Latenzphase läßt sich am ehesten mit den drei folgenden Modellen erklären:

- a) Nach dem im Anhang 5.3.3 diskutierten Modell ist die Bildungsrate für aktive Carrier proportional zur momentanen Rezeptorbesetzung.
- b) Ein systeminhärenter Schritt benötigt immer die gleiche Zeit bis zum Auftreten eines neuen aktiven Carriers.
- c) Ein Schwellenwertmechanismus läßt die Stimulation des Systems erst zu, wenn ein bestimmter Stoff ("second messenger") einen Schwellenwert überschritten hat.

ad a) Als mögliche Mechanismen zu dieser Hypothese wären eine rezeptorbesetzungsabhängige Internalisierung oder die Aktivierung eines Enzyms zu nennen, welches z.B. inaktive Carrier phosphoryliert. Hier würde eine enge Korrelation zwischen Latenzzeit und Bindungshalbwertszeit gefordert. Zumindest bei niedrigen Insulinkonzentrationen kann ein Teil der Latenzphase auf die zeitlich langsam zunehmende Rezeptorbesetzung zurückgeführt werden. Sehr hohe Insulindosen mit einer Halbwertszeit für die Assoziation von 2-3 sec führen jedoch zu keiner weiteren Verringerung des zeitverzögerten Einsetzens der Aktivierung (25). Eine weitere Reduktion kann entweder dadurch begrenzt sein, daß nun der rezeptorproportionale Schritt in eine Sättigungsphase eintritt, oder daß nun ein in b) oder c) beschriebener Post-Rezeptorschritt dominiert.

ad b) Eine konstante Übertragungszeit des Insulinsignals ließe sich z.B. durch obligates Überwinden einer Diffusionstrecke, sei es Lateraldiffusion in der Plasmamembran oder transmembranär, wie sie bei einem Internalisierungsvorgang auftreten würde, erklären. Ebenso sollte der Vorgang eines quasi-exozytotischen Einbaus von Carriern aus Zellorganellen Zeit erfordern. (siehe Abschnitt 4.1)

Um einen Hinweis auf eine Beteiligung einer Lateraldiffusion

am Übertragungsschritt zu bekommen, wurde das in Abschnitt 3.9 beschriebene Experiment durchgeführt. Die Arbeitshypothese dabei war, daß bei verminderter Rezeptorendichte auf der Zelloberfläche eine verlängerte Diffusionszeit zu erwarten wäre, welche quadratisch zur reziproken Dichte wachsen sollte. Eine signifikante Differenz war bei Zellen mit einer um $1/3$ reduzierten Rezeptorendichte ($2,4 \cdot 10^5$ Rezeptoren pro Zelle bei Hyperinsulinämie) im Vergleich zu normalen Kontrollzellen ($3,6 \cdot 10^5$ Rez. pro Zelle) jedoch nicht zu beobachten (Abb. 3.19).

Diesbezügliche Interpretationen werden natürlich durch die Unkenntnis der Topographie der Rezeptoren auf der Zelloberfläche begrenzt, und es ist nicht bewiesen, daß sich durch Änderung der Dichte auch der individuelle Abstand ändert. Letzteres sollte jedoch in dem einfachsten Modell, bei dem die Rezeptoren diffus verteilt sind, erfüllt sein.

Eine grobe Abschätzung von lateralen Diffusionszeiten kann bei Kenntnis der lateralen Diffusionskonstanten D durchgeführt werden. Die Werte von D liegen etwa zwischen $2,8 \cdot 10^{-9}$ cm²/sec (16) und $4 \cdot 10^{-10}$ cm²/sec (49). Mit dem Einsteinchen Diffusionsgesetz

$$\bar{x}^2 = 2 \cdot D \cdot t$$

ergäben sich, wenn man für x die Größenordnung des mittleren Abstandes von Rezeptor zu Rezeptor annimmt ($\sim 0,6 \mu\text{m}$), Diffusionszeiten von 0,6 sec bzw. 4,5 sec.

Somit schließen vorliegende Experimente eine Lateraldiffusion von Rezeptoren, wie sie für eine Rezeptor-Rezeptorkopplung (32,49) oder die Kopplung von Rezeptoren an Effektoren in der Membran (30) notwendig wären, nicht aus, sie scheint jedoch nicht das Zustandekommen der Latenzphase zu bedingen.

ad c) Die schon früher geäußerte Hypothese, die Entstehung der initialen Latenzphase könne durch ein Schwellenwertphänomen bedingt sein (7), konnte bisher weder bewiesen noch widerlegt werden. Durch das in Abschnitt 3.4 beschriebene Experiment der 2-Phasenstimulation war jedoch eine weitgehende Abgrenzung von solchen Phänomenen möglich: Die zugrunde liegende Arbeitshypo-

these dabei war, daß man den angenommenen Schwellenwert mit etwa halbmaximaler Stimulation (durch submaximale Insulindosen) schon erreicht. Nachdem diese Einstellung vollständig abgewartet wurde, sollte eine jetzt mit maximaler Insulindosis aufgenommene Kinetik eine modifizierte Latenzphase ergeben. Die zugrunde liegende Schwellenwerthypothese ließe zwei mögliche Mechanismen und damit Ausgänge des Experimentes für denkbar erscheinen:

- 1.) Bei jeder erneuten Insulinzugabe läuft ein "Triggermechanismus" ab, d.h. es wird ein Intermediärprodukt gebildet, das wiederum, um wirksam zu werden, eine gegebene Schwellenkonzentration überschreiten muß, die durch das schon vorhandene Aktivitätsniveau bestimmt wird. Nach Vorstimulation liegt diese Schwelle höher, d.h. bei gleicher Bildungsrate des hypothetischen Zwischenproduktes wird diese später erreicht. Die Latenzphase wird länger.
- 2.) Eine Vorstufe des Carriers bzw. ein second messenger muß eine bestimmte Schwellenkonzentration erreicht haben, um aktive Carrier zu bilden. Diese Schwellenkonzentration ist durch submaximale Stimulation schon überschritten, sodaß keine erneute Latenzphase mehr auftritt. Die gleichen Überlegungen wie bei einem "second messenger"-Modell gelten auch für ein Modell, bei dem eine Schwelle der Rezeptorbesetzung erst erreicht sein muß, um eine Weiterleitung des Hormonsignals zu ermöglichen.

In dem 2-Phasenexperiment (Abb. 3.8) gab sich keine Abhängigkeit der initialen Latenzzeit von der Vorstimulation zu erkennen, was sehr gegen die Schwellenwerthypothese spricht.

Nach dem bisher Gesagten setzt sich die Latenzphase aus mindestens zwei Prozessen zusammen. Bei niedriger Insulinkonzentration muß ein rezeptorbindungsabhängiger Schritt für die verlängerte Latenzzeit verantwortlich gemacht werden. Bei maximaler Stimulation mit Insulin dominiert wahrscheinlich ein systeminhärenter Mechanismus, der initial ein verzögertes Einsetzen der Transportaktivierung zur Folge hat.

Die Frage, ob es einen einheitlichen "second messenger" für die Signalübertragung des Insulins gibt, wurde noch immer nicht geklärt. Möglicherweise könnte Calcium diese Rolle übernehmen oder bei der Transmitterreaktion als Kofaktor fungieren. Eine Verminderung der Ca^{++} -Ionen mit EDTA im Medium führte zur Verlängerung der initialen Latenzzeit und zu einer Reduktion des Maximaleffektes um 50% (Abb. 3.18). Dies deutet auf eine Beteiligung des Ca^{++} an der Transmitterreaktion hin. Ein einfaches Schwellenwertmodell, in dem die Latenzphase dem intrazellulären Anstieg von Calcium bis zu einer kritischen Schwelle entspricht, ist nach den oben genannten Versuchen unwahrscheinlich. Es ist daher zu vermuten, daß Calcium die Rolle eines Kofaktors bei der Transmitterreaktion spielt. Endo- und Exozytosevorgänge, wie sie bei der Internalisierung von Insulin und bei der Translokation von Carriern stattfinden, sind bekanntermaßen Ca^{++} abhängig (14).

Eine Erniedrigung der Temperatur verlängerte die Latenzphase in charakteristischer Weise. Lassen sich aus diesem Merkmal Schlüsse auf die Kopplungsreaktion ziehen? Hierbei ist zunächst zu beachten, daß bei einer Signalübertragung, die sich aus mehreren Teilreaktionen zusammensetzt, die langsamste Teilreaktion auch die Aktivierungsrate der Gesamtreaktion limitiert. Die Latenzzeit wurde als charakteristische Zeitkonstante für den Kopplungsvorgang angesehen, die in dem Kopplungsmodell (siehe Anhang 5.3.4) mit den Raten verknüpft ist, welche die Reaktionsgeschwindigkeit bestimmen.

Zur Darstellung der Temperaturabhängigkeit wurde ein Arrheniusdiagramm verwendet. (Abb. 3.10). Bei einfachen chemischen Reaktionen zeigt sich dabei im wässrigen Medium eine konstante Steigung, aus der die Aktivierungsenergie abgelesen werden kann. Abweichungen vom linearen Verlauf sind auch möglich; Gründe dafür können u.a. sein:

1. Bei Reaktionssequenzen ein Wechsel der Schrittmacherreaktion.
2. Im Anhang 5.3.4 diskutierte Phänomene, die zu berücksichtigen sind, wenn keine inverse Anfangsgeschwindigkeit benutzt wird.
3. Reaktionsabläufe unter Mitbeteiligung der Plasmamembran,

Sowohl enzymatische Reaktionen, wie auch Bewegungen von Membranproteinen in der Membran werden durch den physikalischen Zustand der Plasmamembran beeinflusst. Da die Fluidität der Phospholipide bei bestimmten Temperaturen Phasenübergänge zeigt, kommen im Arrheniusplot abrupte Änderungen des linearen Verlaufs vor. Dieses Phänomen hat man sich z.B. bei der Untersuchung der Signalübertragung vom β -Rezeptor auf die Adenylatzyklase zunutze gemacht, um zu klären, ob eine permanente Rezeptor-Effektorkopplung vorliegt, oder aber bei der Signalübertragung eine Kopplungsreaktion mit Proteinbewegungen in der Membran abläuft.

Eine durchgehende Linearität, wie sie beim Auftragen der reziproken Latenzphase von Ciaraldi et al.(7) gefunden wurde, ergab sich in den in dieser Arbeit durchgeführten Experimenten nicht. Bis zu einer Temperatur von etwa 30°C zeigte sich ein linearer Verlauf der Arrheniuskurve, aus dem eine Aktivierungsenergie von 17,1 kcal/Mol berechnet werden konnte. Für höhere Temperaturen (37°C) nahm die Latenzzeit nicht weiter ab, wie es die Linearität gefordert hätte. Hier verringert sich die Aktivierungsenergie scheinbar. Dieser Knick bei etwa 30°C könnte auf eine Beteiligung der Fluidität der Zellmembran am Kopplungsvorgang hinweisen. Diese Schlußfolgerung wird durch neuere Ergebnisse von Amatruda et al. (1) und Melchior et al.(44) unterstützt, insbesondere fanden Pilch et al. (46) bei ca. 30°C ebenfalls Hinweise für eine Fluiditätsveränderung der Membranbestandteile. Damit scheint die Fluidität der Plasmamembran eine Bedeutung für die Transmitterreaktion zu haben.

Aus der relativ hohen Aktivierungsenergie schlossen Ciaraldi et al.(7), daß die Kopplungsreaktion metabolische Energie (in Form von ATP) benötigt. Für diese Interpretation gibt es jedoch keine theoretische Grundlage, da eine Auskunft über den Energiebedarf einer Reaktion nur durch die Messung der chemischen Potentiale bzw. der Freien Energie möglich wäre (Vgl. Abschn.5.3.4)

Für einfache Diffusionsvorgänge ist die ermittelte Aktivierungsenergie zu hoch, jedoch wurde für Pinozytoseprozesse an Fibroblasten (51) im gleichen Temperaturintervall ein linearer Arrheniusplot mit einer Aktivierungsenergie von 17,9 kcal/Mol

gemessen, der mit dem hier ermittelten Wert von 17,1 Kcal/Mol erstaunlich gut korreliert. Dies ist jedoch keineswegs beweiskräftig genug, um die Pinozytose als limitierenden Kopplungsschritt zu postulieren.

Eine weitere wichtige Frage, die sich aus den Ergebnissen stellte, war: An welcher Stelle benötigt die Signalübermittlung Energie?

Die Senkung des ATP-Gehaltes der Zelle auf wenige Prozent des Ausgangswertes führte zu einem Sistieren der Aktivierung des Transportsystems, ohne daß eine deutliche Rückkehr zum Basalwert zu erkennen war (Abb. 3.15). Die Signalübertragung läuft also über eine energieverbrauchende oder eine Phosphorylierungsreaktion. ATP-verbrauchende Vorgänge sind unter anderem die schon im Zusammenhang mit der Internalisierung besprochene Endo- bzw. Exozytose. Somit ist auch eine später noch genauer zu analysierende Kernfrage angeschnitten, nämlich: Ist die Internalisierung ein Kettenglied in der Signalübertragung, oder ist ein anderer Fusionsvorgang, wie die Translokation von Carriern aus Zellorganellen in die Plasmamembran die eigentlich energieverbrauchende Reaktion. Eine Phosphorylierungsreaktion könnte in Analogie zur Regulation von Enzymen eine aktivierende Carrierphosphorylierung sein.

Da bei der Transmitterreaktion Ionen, insbesondere Calcium, an der Vermittlung teilhaben könnten, wäre eine Hemmung der Calcium-ATPase denkbar. Dies membranständige Enzym hält in der Zelle eine gegen den Extrazellulärraum um Größenordnungen niedrigere Ca^{++} -Ionenkonzentration aufrecht. Eine Hemmung würde zu einem Anstieg der Calciumkonzentration in der Zelle führen, was wiederum zur Carrieraktivierung führen könnte. Die ATP-Entzugsstudien zeigen jedoch, daß ein ATP-Mangel, der ja ebenso wie möglicherweise Insulin zu einer Hemmung der Ionenpumpe führen sollte, keine Transportaktivierung auslöst, sondern ein Sistieren derselben. Damit tritt auch die Hypothese einer direkten Wirkung von Insulin über den intrazellulären Ca^{++} -Spiegel weiter in den Hintergrund.

Auf den ersten Blick scheint nur die eigentliche Aktivierungsphase ATP-verbrauchend zu sein, während der aktivierte Zustand ATP-unabhängig ist, da er aufrechterhalten bleibt, obwohl ATP nach wie vor abwesend ist. Dies ist jedoch mit dem dynamischen Modell, das in Abschnitt 5.3.1 ff. (Anhang) entwickelt wird, nicht vereinbar. Dieses Modell basiert auf der Beobachtung, daß das System nach Hormonentzug desaktivierbar ist, d.h. nach Auswaschen des Insulins sich wieder die basale Transportrate einstellt. Daher müssen auch im Gleichgewicht Aktivierungs- und Desaktivierungsreaktion nebeneinander ablaufen, um ein konstantes Niveau an aktiven Carriern zu gewährleisten. Unter der Annahme, daß nur die Aktivierung ATP benötigt, sollte der ATP-Entzug zu einer Desaktivierung führen. Da jedoch kein Absinken des Gleichgewichtes erkennbar war, muß angenommen werden, daß auch die Desaktivierung ATP verbraucht. Diese Hypothese ist durch eine kürzlich erschienene Arbeit bestätigt worden (58).

Wurde die ATP-Konzentration nur mäßig gesenkt. und nicht vollständig reduziert, so erfolgte eine verlangsamte Aktivierung und eine Verlängerung der anfänglichen Latenzphase. Jedoch wurde eine vollständige Aktivierung, wenn auch später als normal, erreicht. Würde nur die Aktivierungsrate durch ATP-Ver minderung verlangsamt, so sollte sich nach dem dynamischen Modell ein geringerer Gleichgewichtswert einstellen, d.h. das Aktivierungsmaximum nicht die volle Höhe erreichen. Dies wurde z.B. bei Phosphorylierungsreaktionen von Enzymen beobachtet. Sind jedoch, wie oben diskutiert, Hin- und Rückreaktion der ATP-Reduktion unterworfen, so ist eine volle Aktivierung durchaus möglich, was mit diesem Modell voll konsistent ist.¹⁾

Es soll nun versucht werden, die bisherigen Schlussfolgerungen zu einer Synthese zusammenzufassen:

¹⁾ Anmerkung: Das dynamische Modell fordert hier, daß die Desaktivierungsrate (= Umsatzrate unter Basalbedingungen) im gleichen Verhältnis abnimmt, wie die insulinstimulierte Aktivierungsrate, die ja voraussetzungsgemäß unter ATP-Ver minderung abnimmt, und das Verhältnis von aktiven zu inaktiven Carriern konstant bleibt (Gl. 5.10). Damit sollte auch die Aktivierungsgeschwindigkeit abnehmen, genau was man beobachtet.

Zwei Kennzeichen der Kopplungsreaktion zwischen Insulinbindung und Wirkung waren Ausgangspunkt dieser Arbeit: der Energiebedarf und die initiale Latenzphase. Daraus ergaben sich im wesentlichen folgende Kernfragen: Wo ist der energieverbrauchende, und wo der die Latenzphase induzierende Schritt in der Kette der Signalübermittlung lokalisiert? Ist die Internalisierung, für deren Energieabhängigkeit hier ein zusätzlicher Beweis erbracht werden konnte, eine notwendige Voraussetzung für die Wirkung des Insulins auf den Glucosetransport?

Die kinetischen Experimente und ein dazu entworfenen dynamisches Modell zeigten, daß sowohl die Aktivierung, wie auch die Desaktivierung des Transportsystems ATP-abhängig sind. Diese Doppelforderung schränkt die bereits genannten potentiellen Mechanismen zur Vermittlung des Hormonsignals beträchtlich ein. Immerhin sind Vorgänge bekannt, die bei gegenläufigem Effekt gleichermaßen ATP-abhängig sind, nämlich solche die auf Endo- und Exozytose beruhen.

Die Latenzphase konnte bei submaximalen Insulinkonzentrationen mit der Rezeptorbindung korreliert werden; bei hohen Insulinkonzentrationen zeigte sich ein systeminhärenter Schritt, der keine Eigenschaften eines Schwellenwertmechanismus aufwies. Eine transmembranäre oder intrazelluläre Translokationszeit käme in Frage.

Zwei kürzlich beschriebene Vorgänge, die Internalisierung von Insulin, wie auch die Carriertranslokation beruhen auf Endo- bzw. Exozytosevorgängen und sollten eine Translokationszeit aufweisen. Die Internalisierung konnte mit Chloroquin, einer Hemmsubstanz des lysosomalen Abbauweges, und unter ATP-Mangel nachgewiesen werden. Dieser Vorgang ist bei 15°C nicht mehr meßbar, während bei dieser Temperatur noch eine Transportaktivierung möglich war. Kono et al. (36) fanden bei dieser Temperatur keine Wirkung des Insulins mehr. Dies kann jedoch methodisch mit der Tatsache erklärt werden, daß diese Autoren schon 5 Minuten nach der Insulinzugabe die Messung vornahmen. Dies ist angesichts der langen Latenzphase bei dieser Temperatur zu kurz. Auch bei 37°C war die Einschleusung in den lysosomalen

BINDUNG

WIRKUNG

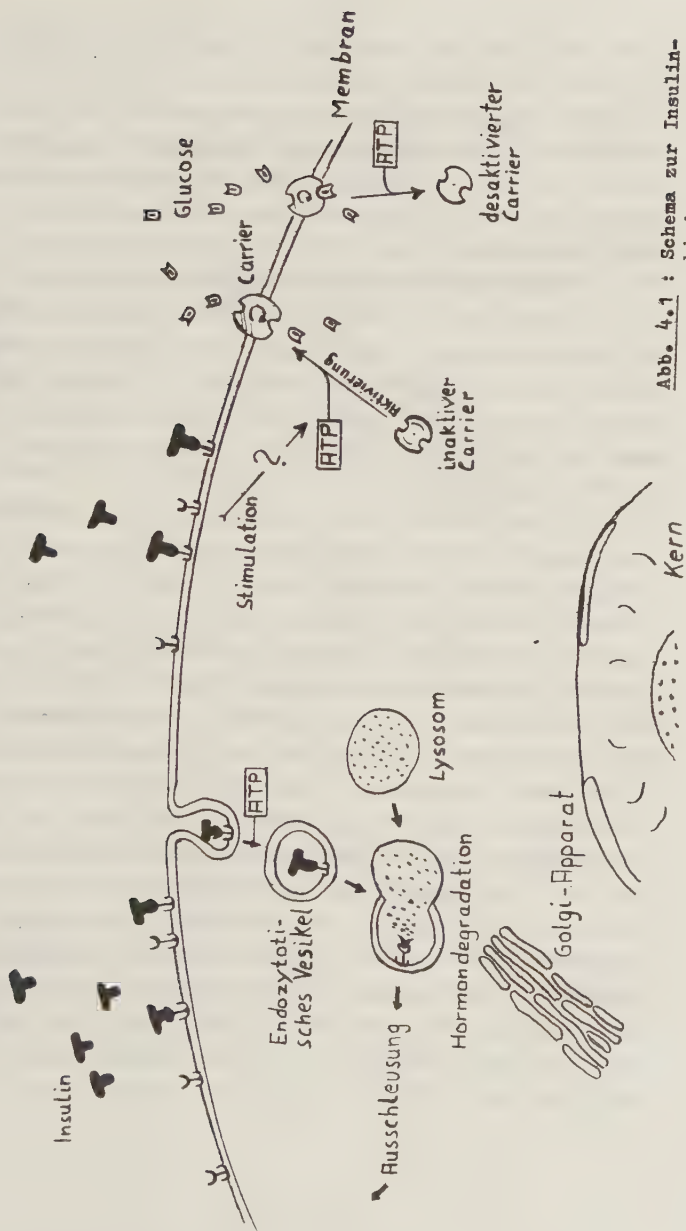


Abb. 4.1 : Schema zur Insulinbindung und Wirkung

Abbau erst nach dem Beginn der Aktivierung nachweisbar. Beides macht den Vorgang der Internalisierung von Insulin als Voraussetzung für seine Wirkung auf den Glucosetransport eher unwahrscheinlich. Eine weitere Abklärung, z.B. durch Substanzen, die noch selektiver lediglich die Internalisierung hemmen, die Rezeptorbindung und andere Stoffwechselvorgänge in der Zelle aber unbeeinflusst lassen, ist sicher wünschenswert.

Somit tritt das Modell der insulininduzierten Carrier-translokation weiter in den Vordergrund. Hierbei wäre die letzte Konsequenz darin zu sehen, daß Insulin seiner Zielzelle den Befehl gibt, durch Einbau intrazellulär vorhandener Membranbauteile eine neue Struktur der Plasmamembran zu bilden, in der neue oder potentere Carrier einen vermehrten Zuckereinstrom bewerkstelligen könnten.

Es sollen hier am Schluß noch einige Bemerkungen darüber gemacht werden, welche direkt klinisch verwertbaren Ergebnisse aus dem derzeitigen Stand des Wissens folgen. Die verlangsamte bzw. aufgehobene Insulinwirkung unter ATP-Mangel dürfte bei pathologisch intrazellulärem ATP-Mangel eine Rolle spielen. In hypoxischem Gewebe (z.B. Schock) sollte der verminderte ATP-Spiegel nur eine verlangsamte Insulinwirkung zur Folge haben, wobei sich die maximale Wirkung doch voll entfalten kann. In anoxischem Gewebe (z.B. Folgezustände einer lokalen Minderdurchblutung) ist ebenso wie in Zellen, die mit toxischen Dosen von Atmungsketteninhibitoren in Verbindung kamen, mit einer hochgradigen Insulinresistenz zu rechnen. Durch den dadurch entstehenden intrazellulären Glucosemangel kann es zu weiterer ATP-Reduktion, und so zu einem Circulus vitiosus kommen. Da diese Resistenz auf einer Hemmung eines Postrezeptorschrittes beruht, kann sie auch durch hohe Insulindosen nicht überwunden werden. Der Circulus vitiosus kann nur durch eine Behebung der Hypoxie selbst durchbrochen werden.

5. A N H A N G

5.1 Extrapolationsverfahren zur Ermittlung der Anfangsgeschwindigkeit des Einstroms von 3-O-Methylglucose in Fettzellen (nach Kotyk und Janáček (37) S.263)

Durch Bestimmung von 4 Meßpunkten in äquidistanten Zeitabständen, z.B. bei 4,8,12 und 16 sec, kann durch Newtonsche Extrapolation auf die Anfangsgeschwindigkeit bei t=0 geschlossen werden.

Die Formel lautet

$$v = \Delta_1 - \frac{\Delta_2}{2} + \frac{\Delta_3}{3} + \frac{\Delta_4}{4}$$

Die Bedeutung sei hier an einem Beispiel aus Abb. 3.2 A erläutert:

t	%	Δ_1	Δ_2	Δ_3	Δ_4
		55			
4 sec	55		-28		
8 sec	82	27		10	
			-18		3
12 sec	91	9		13	
			-5		
16 sec	95	4			

$$v = 55 - \left(\frac{-28}{2} \right) + \frac{10}{3} - \frac{3}{4} = 71,6 \% \text{ in 4 sec}$$

$$\hat{=} 17,9 \% \text{ in 1 sec}$$

Dies weicht beträchtlich von dem Wert 13,7 % ab, den man erhalten hätte, wenn man nur den ersten Punkt berücksichtigt hätte.

5.2 Zusammenstellung von Literaturangaben über die Parameter
des Glucosetransportsystems für 3-O-Methylglucose

* (I) = Insulin-stimuliert (B) = basal

Autor	K_m *	V_{max} *	Methode	berechnet durch
Vinten (59)	8 mM (I) 5 mM (B)	1,7 mMol/ltr s 0,21 mMol/ltr s	Gleichgewichts- austausch	Diagramm 37°C HWZ - Konzentration
Vinten, Gliemann (60)	5 mM (I) 5 mM (B)	1,7 mMol/ltr s 0,07-0,2 mMol/ltr sec	Gleichgewichts- Tracer-Ausfluß	Diagramm 37°C HWZ - Konzentration
Czech (12)	4 mM (B)	180 pMol/min pro 10^7 Zell. St. 1,5-3 fach	Braune Fettzellen Nettoaufnahme	Lineweaver-Burk Plot 23°C
Whitesell (62)	3,5 mM (B) 3,5 mM (I)	0,13 mMol/ltr s 0,8 mMol/ltr sec	Gleichgewichts austausch	Hane-Diagramm 22°C
Livingstone (40)	7,5 - 10 mM (B+I)	0,08 - 0,14 mMol/ltr s (B) 0,54 mMol/l s (I)	Gleichgewichts- Tracer-Ausfluß	HWZ-Konzentration Diagramm 37°C
Siegel (51)	6,6 $\pm$ 1,2 mM (B+I)	0,4 $\pm$ 0,1 (B) 2,2 $\pm$ 0,3 (I) mMol/min pro 2 10^5 Zellen	Netto-Aufnahme	Lineweaver - Burk Diagramm 24°C

5.3 Modelle und theoretische Berechnungen

Auch ohne eine genaue Kenntnis der signalübertragenden Schritte der Insulinwirkung kann man unter Zuhilfenahme einfacher biochemischer und thermodynamischer Grundprinzipien Modelle für diesen Prozess entwickeln und Modellrechnungen aufstellen. Es lassen sich für die jeweiligen Modelle spezifische Kurvenverläufe berechnen, die mit den experimentellen Daten verglichen werden können.

Im folgenden Abschnitt wird ein einfaches Modell diskutiert, das die Bereitstellung von neuen Glucosetransportcarriern als chemische Reaktion beschreibt, bei der inaktive in aktive Carrier überführt werden. Durch eine derartige Analyse ist es möglich, zu einem besseren Verständnis der Insulinwirkung und des ATP-Entzugs auf die Aktivierung des Transportsystems zu gelangen. Der Versuch, die übliche approximative mathematische Beschreibung der Insulin-Rezeptorkopplung mit der Carrieraktivierung zu koppeln, wird in Abschnitt 5.3.3 behandelt. Damit läßt sich zeigen, daß sowohl Insulin-Rezeptorbindung wie auch ein unbekannter Transmitterschritt die Länge der Latenzphase bestimmen. Am Schluß dieses Kapitels wird noch untersucht, inwieweit die in der Literatur verwendete Methode (7), die die Temperaturabhängigkeit des Kopplungsvorganges in einem Arrheniusdiagramm beschreibt, auf die Transportaktivierung anwenden läßt.

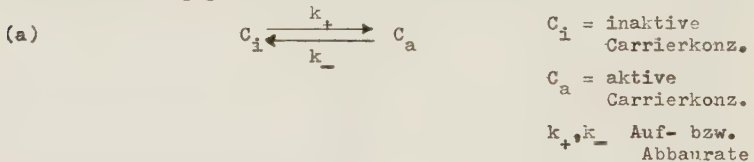
A n m e r k u n g : Es wird hier versucht, die wichtigsten Ergebnisse, die aus den mathematischen Überlegungen folgen, in einem gekennzeichneten Abschnitt, der sich den Rechnungen anschließt, zusammenzufassen. Damit soll auch dem Leser, der sich nicht im Detail mit den kinetischen Gleichungen auseinandersetzen will, die Möglichkeit geboten werden, die wesentlichen Resultate dieses Kapitels zu erfahren.

5.3.1 Grundgleichungen einer Aktivierungsreaktion bei der Transportstimulation

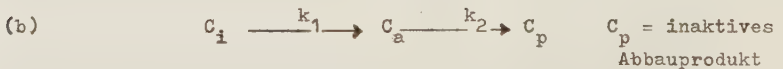
Diesem Abschnitt sei folgende Arbeitshypothese zu Grunde gelegt:

- Im Gleichgewicht wird eine k o n s t a n t e Anzahl von Glucosetransportcarriern durch ständigen Auf- und Abbau bereitgestellt.
- Bei Hormonzugabe wird dieses Gleichgewicht gestört durch Veränderung der Auf- oder Abbaurates.

Dieses Gleichgewicht kann ein dynamisches Gleichgewicht im Sinne des Massenwirkungsgesetzes sein (a)



oder ein Fließgleichgewicht (b)



Sei C_{ges} die Gesamtzahl der verfügbaren (aktiven+ inaktiven) Carrier, so kann der Fall (a) als Reaktion 1. Ordnung behandelt werden.

$$<5.1> \quad \frac{dC_a(t)}{dt} = k_+ (C_{\text{ges}} - C_a) - k_- \cdot C_a$$

$$<5.2> \text{ Lösung: } C_a(t) = \frac{k_+}{k_+ + k_-} \cdot C_{\text{ges}} (1 - e^{-(k_+ + k_-)t})$$

Diese Gleichung beschreibt die Carrierkonzentration als Funktion der Zeit. Die charakteristischen Größen dieses Vorganges sind:

- Die Anfangsgeschwindigkeit $V = k_+ \cdot C_{\text{ges}}$

- Gleichgewichtswert bei sehr großen Zeiten ($t \rightarrow \infty$)

$$<5.2> \quad C_a(t \rightarrow \infty) = \frac{k_+}{k_+ + k_-} \cdot C_{\text{ges}}$$

- Ein Maß für die Zeit, innerhalb derer das Gleichgewicht

$$<5.3> \quad \text{erreicht wird, ist die Zeitkonstante } \tau = \frac{1}{k_+ + k_-} \text{ sowie die}$$

- Halbwertszeit bis zum halben Gleichgewichtswert

$$<5.4> \quad T_{1/2} = \frac{\ln 2}{k_+ + k_-}$$

Diese Gleichungen können, setzt man eine konstante Insulinkonzentration im Medium voraus, auch bei der Insulin-Rezeptorbindung Anwendung finden.

Im Fall (b) ergibt sich entsprechend

$$<5.5> \quad \frac{dC_a(t)}{dt} = k_1 C_i - k_2 C_a$$

$$<5.5a> \text{Lösung: } C_a(t) = \frac{k_1}{k_2} C_i (1 - e^{-k_2 t})$$

- Die basale Umsatzrate nach sehr großer Zeit ist

$$<5.6> \quad k_1 C_i = k_2 C_a(t=\infty) \equiv V_{\text{Basal}}$$

- Hieraus ergibt sich der Gleichgewichtswert $C_a(t=\infty)$

$$<5.7> \quad C_a(t=\infty) = \frac{k_1}{k_2} C_i$$

- In diesem Fall ist die Zeitkonstante τ

$$<5.8> \quad \tau = \frac{1}{k_2}$$

Im Gleichgewicht wird eine konstante Zahl von Glucosecarriern dadurch aufrecht erhalten, daß mit einer definierten Rate ständig ein Aufbau neben einem gleichgroßen Abbau stattfindet. Dieser Gleichgewichtswert sowie die Zeit für die Einstellung des Gleichgewichtes ist eine Funktion dieser Raten. Die Umsatzgeschwindigkeit ist das Produkt aus einer Rate und einer Carrierkonzentration.

5.3.2 Mögliche Mechanismen der Hormonstimulation

Im oben dargelegten Modell bieten sich zur Erklärung der Stimulation durch Insulin zwei Möglichkeiten an, die zu einer erhöhten Carrierkonzentration führen: (Zur Vereinfachung sei hier nur der biologisch relevantere Fall (b) behandelt, für den Fall (a) gelten entsprechende Überlegungen, deren Ergebnisse sich prinzipiell von den hier dargestellten nicht unterscheiden)

I.) Die Bildungsrate k_1 wird erhöht auf $\bar{k}_1$

II.) Die Abbaurrate k_2 wird erniedrigt auf $\bar{k}_2$

In beiden Fällen stellt sich ein neues Gleichgewicht ein, für das im Fall I.) gilt

$$<5.9> \quad \bar{k}_1 \bar{C}_i = k_2 \bar{C}_a \quad \bar{C}_a = \text{Carrierzahl im insulinstimulierten Zustand}$$

Die Umsatzgeschwindigkeit ist nun von der basalen Geschwindigkeit $V_{\text{Basal}} = k_1 C_i$ auf die stimulierte Geschwindigkeit $\bar{V} = \bar{k}_1 \bar{C}_i$ erhöht worden.

Aus <5.6> und <5.9> folgt:

$$<5.10> \quad \bar{C}_a(t=\infty) = \frac{\bar{V}}{V_{\text{Basal}}} C_a(t=\infty)$$

Man sieht, daß $\bar{C}_a(t=\infty) > C_a(t=\infty)$.

Die Stimulation hat zunächst das bestehende basale Gleichgewicht gestört, und es erfolgt eine Einstellungsbewegung in das neue Gleichgewicht mit der Anfangsgeschwindigkeit ¹⁾

$$<5.11> \quad V_{\text{Aktivierung}} = \bar{V} - V_{\text{Basal}},$$

was sich mit Hilfe von Gl. <5.10> auch ausdrücken läßt als

$$<5.11a> \quad V_{\text{Aktivierung}} = \left(\frac{\bar{C}_a}{C_a} - 1 \right) \cdot V_{\text{Basal}}$$

¹⁾Anmerkung: Auch wenn nicht ausdrücklich vermerkt, sind im Folgenden bei allen Geschwindigkeiten die Anfangsgeschwindigkeiten angegeben, die die Einstellungsvorgänge charakterisieren.

Diese Gleichung ist insofern bemerkenswert, als sich damit die einzig unbekannte Größe, die basale Umsatzrate der Carrier V_{Basal} berechnen läßt, da das Verhältnis von basaler zu aktivierter Transportrate ebenso bekannt ist, wie die Aktivierungsgeschwindigkeit $V_{\text{Aktivierung}}$.

Will man dies Ergebnis auf die experimentellen Werte der Glucosetransportstimulation, die sich aus Abb. 3.6 ablesen lassen, anwenden, so muß nur noch berücksichtigt werden, daß die maximale Glucosetransportgeschwindigkeit proportional zur aktiven Carrierkonzentration ist.

$$V_{\text{max}}(\text{Glucosetransport}) = K \cdot C_a$$

Da K unbekannt ist, lassen sich absolute Carrierkonzentrationen nicht angeben, stattdessen sollen sie wegen der Proportionalität hier in den Einheiten der Transportgeschwindigkeit angegeben werden = %IZVR/5s.

Nach Abschn. 3.4 ergibt sich

$$\frac{\bar{C}_a}{C_a} = \frac{65\% \text{IZVR}/5s}{7,5\% \text{IZVR}/5s} = 8,6$$

und damit nach <5.11a>

$$V_{\text{Aktivierung}} = 7,6 V_{\text{Basal}}$$

V_{Basal} ist also um den Faktor 7,6 geringer als die Aktivierungsrate. Mit V_{Basal} ist auch $\bar{V}$, die Carrierbildungs- und Abbaurrate im stimulierten Zustand bekannt:

$$<5.12> \quad \bar{V} = \frac{\bar{C}_a}{C_a} \cdot V_{\text{Basal}} = 8,6 V_{\text{Basal}}$$

$$<5.12a> \text{ oder } \bar{V} = \frac{V_{\text{Aktivierung}}}{1 - \frac{C_a}{\bar{C}_a}} = 1,1 V_{\text{Aktivierung}}$$

Weiterhin ist auch die Destimulationsrate nach plötzlichem Hormonentzug berechenbar

$$<5.13> \quad V_{\text{Desakt.}} = V_{\text{Basal}} \left(1 - \frac{\bar{C}_a}{C_a} \right) = -V_{\text{Aktivierung}}$$

Ist das System, wie in Abschn. 3.4 beschrieben, vorstimuliert, sodaß für die im Gleichgewicht befindliche Carrierkonzentration $C_a(\text{Vst.})$ gilt

$$C_a < C_a(\text{Vst.}) < \bar{C}_a$$

so gilt für die Aktivierungsgeschwindigkeit $V(Vst.)$ auf volle Carrierkonzentration

$$<5.13> \quad V(Vst.) = V_{Aktivier.} \frac{\bar{C}_a - C_a(Vst.)}{\bar{C}_a - C_a}$$

Dies führt dazu, daß die nachfolgende Aktivierungsgeschwindigkeit entsprechend dem Grad der Vorstimulation abfällt.

Für halbmaximale Vorstimulation errechnet man

$$V(Vst.) = \frac{11,4\%IZVR/5s}{\min}$$

Der gemessene Wert lag bei etwa

$$12 \pm 1,5 \frac{\%IZVR/5s}{\min},$$

was als gute Übereinstimmung gewertet werden kann.

Wird die Abbaurrate k_2 vermindert (Fall II.) auf $\bar{k}_2$, so ergibt sich entsprechend :

$$<5.14> \quad V_{Aktivierung} = V_{Basal} - \bar{k}_2 C_a$$

und, da im Gleichgewicht wieder $V_{Basal} = \bar{k}_2 \bar{C}_a$,

$$<5.15> \quad V_{Aktivierung} = V_{Basal} \left(1 - \frac{C_a}{\bar{C}_a} \right).$$

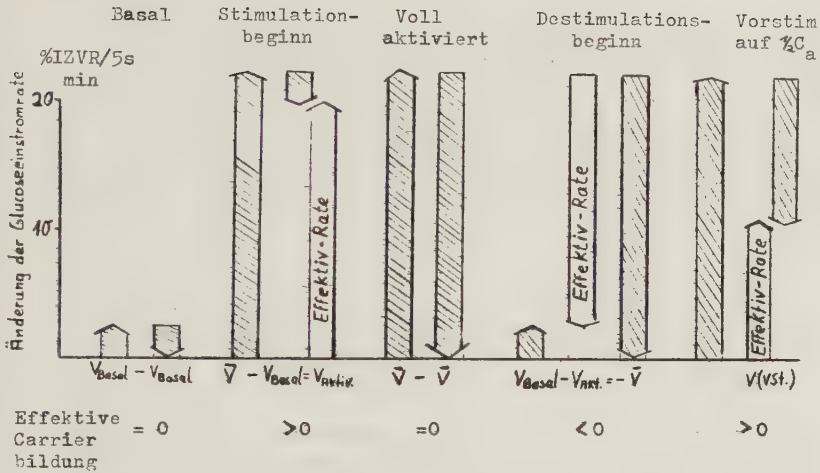
Mit den Ergebnissen von Abschnitt 3.4 ergibt sich entsprechend

$$V_{Aktivierung} = 0,88 V_{Basal}$$

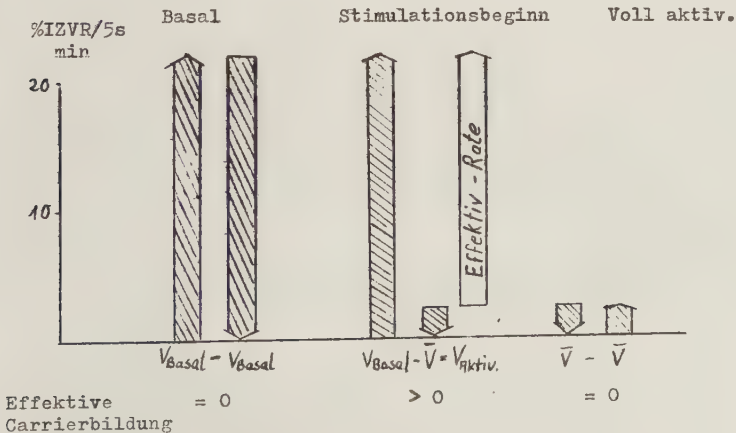
Hier ist die basale Umsatzrate um den Faktor 8,6 höher als im Fall I.) .Bei der Desaktivierung und Vorstimulation ergeben sich keine Unterschiede zu Fall I.).

Wird das basale Gleichgewicht, bei dem mit einer basalen Umsatzrate gleich viele Carrier erzeugt und vernichtet werden, durch Insulin derart gestört, daß die Bildungsrate für Carrier erhöht wird, so resultiert eine erhöhte Carrierkonzentration, die sich mit einer definierten Anfangsgeschwindigkeit einstellt. Die aus dieser Anfangsgeschwindigkeit berechenbare basale Umsatzgeschwindigkeit ist experimentell nicht beobachtbar und ist hier um den Faktor 8,6 mal niedriger als die Aktivierungsgeschwindigkeit.

In einem Diagramm seien die Verhältnisse für das Glukosetransportsystem hier durchschaubarer gemacht :



Wird das basale Gleichgewicht andererseits dadurch verändert, daß die Carrierabbaurate erniedrigt wird, so resultiert auch hier eine erhöhte Carrierkonzentration im Stimulationsgleichgewicht. Der Unterschied zum oben stehenden Fall besteht darin, daß hier die basale Umsatzgeschwindigkeit größer wäre als die experimentell bestimmbare Aktivierungsgeschwindigkeit

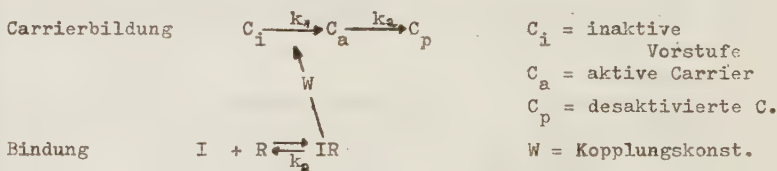


Mit vorliegenden Daten kann zwischen den beiden möglichen Fällen der Beeinflussung des Systems durch Insulin experimentell nicht unterschieden werden. Aus teleologischer Sicht muß jedoch der erste Fall, bei dem die Carrierbildungsrate erhöht wird, als viel ökonomischer für die Zelle angesehen werden, da hier in Abwesenheit von Insulin der Grundumsatz von Carriern etwa 8,6 fach geringer wäre als im zweiten Fall (Verminderung der Abbaurate).

5.3.3 Modell einer Kopplung von Bindung und Wirkung

Im vorhergehenden Abschnitt wurde angenommen, daß die Insulinwirkung augenblicklich die Carrieraktivierungsrate erhöht. Bedenkt man jedoch, daß im Moment der Insulinzugabe noch nicht alle Rezeptoren, die eine Wirkung vermitteln, besetzt sind, so scheint die Annahme gerechtfertigt, daß mit zunehmender Rezeptorbesetzung die Aktivierung der Carrierbildungsrate sukzessive steigt.

Diesen Vorgang versucht folgendes Modell miteinzubeziehen :



Bei diesem Modell wird angenommen, daß die Rate, mit der neue Carrier gebildet oder aktiviert werden, p r o p o r t i o n a l zur Rezeptorbesetzung ist.

Modellrechnung:

Die Rezeptorbindung erfolgt nach dem Exponentialgesetz

$$< 5.16 > \quad R_B = R_{Gl} \left(1 - e^{-\frac{t}{\tau_R}} \right)$$

R_B = besetzte
Rezeptorkonz.

R_{Gl} = besetzte
Rezeptorkonz.
im Gleichgew.

$\tau_R = \frac{1}{k_R}$ = Bindungs-
zeitkonstante

während die Carrierbildung der Gleichung <5.5> genügt

$$<5.5> \quad \frac{dC_a}{dt} = k_1 C_i - k_2 C_a$$

Wir erreichen die Kopplung durch $k_1 = W R_B$

Durch Verknüpfung von <5.16> und <5.5> erhält man dann die inhomogene lineare Differentialgleichung 1. Ordnung :

$$\frac{dC_a}{dt} = W \cdot R_{GL} \left(1 - e^{-\frac{t}{\tau_R}} \right) C_i - k_2 C_a$$

Die Lösung ist:

$$<5.17> \quad C_a = \frac{W R_{GL} C_i}{k_2} \left(1 + \frac{k_R}{k_2 - k_R} e^{-k_2 t} - \frac{k_2}{k_2 - k_R} e^{-k_R t} \right) + K e^{-k_2 t}$$

Die Konstante K wird so gewählt, daß die Anfangsbedingung

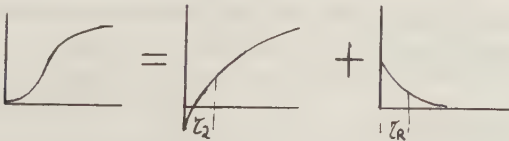
$$C_a(t=0) = 0 \text{ erfüllt ist} \Rightarrow K = 0$$

$$\text{Außerdem ist } C_a(t \rightarrow \infty) = \frac{W R_{GL} C_i}{k_2} \equiv \bar{C}_a$$

Die zunächst unhandliche Gleichung enthält zwei typische Relaxationszeiten $\tau_2 = 1/k_2$ und $\tau_R = 1/k_R$, wobei erstere für die Einstellzeit des Carriersystems, und letztere für die Bindung zuständig ist. In diesen Relaxationszeiten ausgedrückt lautet

<5.17> nun

$$<5.17a> \quad C_a = \bar{C}_a \cdot \left(1 + \frac{\tau_2}{\tau_R - \tau_2} e^{-\frac{t}{\tau_2}} - \frac{\tau_R}{\tau_R - \tau_2} e^{-\frac{t}{\tau_R}} \right)$$



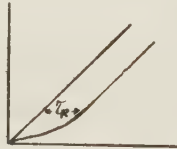
Der Einstellungsvorgang, der die Carrier von ihrer basalen auf ihre stimulierte Konzentration anhebt, setzt sich nun additiv aus 2 Anteilenzusammen, wie dies unter <5.17a> skizziert ist: Aus 1.) einem exponentiellen Einschwenken in den Gleichgewichtswert, wie dies durch sofortiges Erhöhen von k_1 zum Zeitpunkt $t = 0$ zu erwarten wäre.

Aus 2.) einem mit der Bindungsrelaxationszeit exponentiell abnehmenden Term, welcher in der Summe zu einem verzögerten Anstieg führt.

Um zu ergründen, wie groß diese Verzögerungszeit ist, entwickeln wir 5.17a wegen $\tau_2 \ll \tau_R$ in eine Potenzreihe mit Abbruch nach dem 1. Glied, wodurch die Anfangsphase näher be-

trachtet werden kann. Dies ergibt:

$$<5.18> \quad C_a = \frac{C_{GI}}{\tau_2 - \tau_R} \left[t + \tau_R \left(e^{-\frac{t}{\tau_R}} - 1 \right) \right]$$



Man erkennt aus dem zu Gleichung <5.18> zugehörigen Diagramm, daß ein bindingsabhängiger Term zu einer Parallellverschiebung vom Betrage τ_R führt.

Die Kopplung von Bindung und Transportaktivierung durch ein Bindungs-proportionales Glied führt bei der Aktivierungs-kinetik zu einem zeitverzögerten Einsetzen der Aktivierung vom Betrage

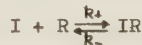
$$<5.19> \quad \text{Initiale Verzögerungszeit} = \tau_R = \text{Bindungszeitkonstante} \\ = \text{Halbwertszeit der Bindung} \times 1,45$$

Nach diesem Modell ließe sich also die initiale Latenzphase als reiner Bindungseffekt verstehen, und ihre Dauer mit der charakteristischen Bindungszeitkonstanten korrelieren.

Die theoretische Voraussage <5.19> ist experimentell direkt zu überprüfen. Die Größe ist von der Insulinkonzentration über <5.3> abhängig, wenn k_+ durch $k_+ I$ ersetzt wird.

$$\tau_R = \frac{1}{k_+ I + k_-}$$

I = Insulinkonzentration



Eine steigende Insulinkonzentration sollte daher zu einer zunehmenden Verkleinerung der Latenzphase führen. Für submaximale Insulinkonzentrationen stimmt dieses Postulat mit den experimentellen Befunden überein (19,25); eine weitere Erhöhung der Insulinkonzentration kann jedoch die initiale Latenzzeit nicht zum Verschwinden bringen. Auch bei sehr hohen Insulinkonzentrationen beträgt diese dann immer noch 40-50 sec.

Da sich experimentell zeigt, daß durch hohe Insulinkonzentrationen mit extrem kurzen Bindungshalbwertszeiten die initiale Latenzphase nicht verschwindet, muß neben dem Bindungseffekt, der sich im wesentlichen nur bei submaximalen Insulinkonzentrationen bemerkbar macht, noch ein zusätzlicher zeitverbrauchender Transmitterschritt postuliert werden.

Der Gleichgewichtswert $\bar{C}_a$, dh. die Glucosetransportrate im stimulierten Zustand, sollte direkt proportional zur Rezeptorbesetzung sein, welche folgende Insulinabhängigkeit in 1. Näherung aufweist.

$$R_{Gl} = \frac{R_{ges}}{1 + \frac{k_-}{k_+ I}} \quad R_{ges} = \text{Gesamte Rezeptorkonz.}$$

Auch hier gilt die experimentelle Erfahrung, daß niedrige Insulinkonzentrationen die Höhe der Transportstimulation kontrollieren. Bei einer Insulinkonzentration von ca. 50 $\mu\text{E/ml}$ ist der Glucosetransport jedoch schon voll aktiviert und kann durch weitere Steigerung der Insulinkonzentration nicht weiter erhöht werden, obwohl etwa erst 5% der Insulinrezeptoren besetzt sind. Dieses Phänomen, daß an Fettzellen sogenannte "spare-rezeptors" existieren, begrenzt ebenfalls die Aussagekraft des Modells.

5.3.4 Die initiale Latenzzeit im Arrheniusdiagramm

In Abschnitt 3.5 und in der Literatur (7) wurde die initiale Latenzzeit in ihrer Temperaturabhängigkeit in einem Arrhenius-Diagramm aufgetragen. Hierbei wurde vereinfachend angenommen, daß dies mit der Arrheniusformel vereinbar ist, obwohl kein Hinweis darauf vorliegt, daß die Latenzzeit eine reziproke Anfangsgeschwindigkeit ist. Ob und wie die Aussagekraft der in 3.5 dargestellten Ergebnisse durch diese Vereinfachung beschränkt wird, soll im Folgenden untersucht werden.

Wird, wie zuvor angenommen, die Kopplung von Bindung und Wirkung von chemischen Reaktionen getragen, so müssen bezüglich

des Temperaturverhaltens zwei Dinge sorgfältig unterschieden werden:

- Die Triebkraft für eine Reaktion, welche im Gleichgewicht das Verhältnis von Ausgangsverbindung zu Produkt bestimmt, wird durch die "Freie Enthalpie" oder das chemische Potential vermittelt.
- Die Geschwindigkeit, mit der diese Gleichgewichtseinstellung erfolgt, also die Raten für Bildungs- und Abbauraten wird durch die im Arrhenius-Diagramm ermittelte Aktivierungsenergie bestimmt.

Im Arrhenius-Diagramm wird die Auftragung der Anfangsgeschwindigkeit der zu untersuchenden Reaktion gefordert, um nur die "Hin"-Reaktion zu erfassen. Wird wie bei Ciaraldi et al. (7) und wie in Abschn. 3.5 die reziproke Latenzzeit in den Ordinatenwert einbezogen, so muß diese wegen ihrer endlichen Dauer weniger als Repräsentant für die Anfangsgeschwindigkeit als vielmehr als charakteristische Zeitkonstante dieser Reaktion aufgefasst werden. Dies wird deutlich, wenn nach dem Konzept von Abschn. 5.3.3 die Latenzzeit mit der Zeitkonstanten für die Bindung korreliert wird, einer Zeit, deren Reziprokwert sich additiv aus der Rate für Hin- und Rückreaktion zusammensetzt. Ohne dieses Bindungsmodell speziell zu Grunde zu legen, ergibt sich im allgemeinen Fall für die Zeitkonstante der hypothetischen Kopplungsreaktion (nach 5.3):

$$5.3a \quad \frac{1}{\tau} = k_+ + k_-$$

Die Temperaturabhängigkeit beider Größen ist

$$\begin{aligned} k_+ &= k_0 e^{-\frac{E_a}{RT}} & E_a &= \text{Aktivierungsenergie} \\ k_- &= k_0 e^{-\frac{(E_a - \Delta H)}{RT}} & \Delta H &= \text{Freie Enthalpie für} \\ & & & \text{die Kopplungsreaktion} \end{aligned}$$

Dann ist

$$\frac{1}{\tau} = k_0 e^{-\frac{E_a}{RT}} \left(1 + e^{\frac{\Delta H}{RT}} \right)$$

$$\text{und} \quad \ln \tau = \ln k_0 - \frac{E_a}{RT} + \ln \left(1 + e^{\frac{\Delta H}{RT}} \right)$$

Man erkennt, daß nur der letzte Summand neu in dieser modifizierten Arrheniusformel auftritt.

3 Fälle müssen unterschieden werden

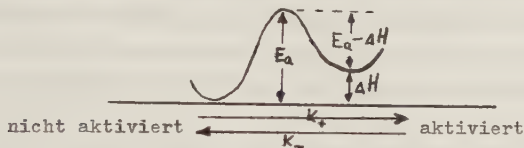
-i- Stark endotherme Reaktion $\Delta H \ll RT$:

Steigung im Arrhenius-Diagramm ist $-E_a$ weil $e^{-\frac{\Delta H}{RT}} \ll 1$

-ii- Stark exotherme Reaktion $\Delta H \gg RT$: Steigung

im Arrhenius-Diagramm ist $E_a - \Delta H$ weil $e^{-\frac{\Delta H}{RT}} \gg 1$

-iii- Zwischenbereich einer schwach endo- oder exothermen Reaktion $-RT \leq \Delta H \leq RT$: Hier wird die Arrhenius-Kurve mit wachsender Temperatur steiler.



Man erkennt, daß bei stark endothermen Reaktionen nur die Aktivierungsenergie der "Hin"-Reaktion, bei stark exothermen Reaktionen nur die der "Rück"-Reaktion das Arrhenius-Diagramm bestimmt, welches in beiden Fällen linear wird. Im energetischen Zwischenbereich ist eine Nichtlinearität zu erwarten.

Diese Rechnung zeigt, daß die Darstellung der initialen Verzögerungszeit in einem Arrhenius-Diagramm nach rein thermodynamischen Überlegungen (ohne Einbeziehung der Plasmamembran) einen linearen Verlauf erwarten ließe, wenn man von einem energetischen Zwischenbereich absieht. In diesem Bereich sollte der Verlauf mit wachsender Temperatur steiler werden; die experimentellen Ergebnisse zeigen jedoch, daß die Kurve mit steigender Temperatur abflacht. Daher kann der nichtlineare Verlauf mit thermodynamischen Überlegungen nicht erklärt werden und muß anders interpretiert werden. Unter Beachtung oben stehender Ausführungen bestehen gegen die Anwendung des Arrhenius-Plots im vorliegenden Fall keine Bedenken.

Kann die ermittelte Steigung einer konkreten Aktivierungsenergie zugeordnet werden? Dies ist möglich, wenn man beachtet, daß nur bei einer exothermen Kopplungsreaktion die Steigung als die Aktivierungsenergie der "Hin"-Reaktion und bei einer endothermen Reaktion als die der "Rück"-reaktion interpretiert werden muß.

6. Z U S A M M E N F A S S U N G

An isolierten Fettzellen der Ratte wurden Versuche zur Charakterisierung der Überleitung des Insulinsignals vom Rezeptor auf das Glucosetransportsystem durchgeführt.

Mit einem neuen Meßverfahren wurde zunächst das Glucosetransportsystem analysiert und die spezifischen Parameter untersucht: Die Affinitätskonstante zum Transportsystem ändert sich unter Insulinzugabe kaum, während die maximale Transportgeschwindigkeit $V_{\max}$ durch Insulin etwa 8,5-fach erhöht wird. Diese Befunde stehen im Einklang mit der Literatur und deuten auf eine Mobilisierung gleichartiger Carrier durch Insulin oder eine Änderung der Durchtrittsrates durch die Membran hin. Mit dem Phänomen des Gegenverkehrs wurde ein weiteres Indiz für einen carriervermittelten Transport gefunden, der sich auch theoretisch gut beschreiben läßt.

Bei der Kinetik der Insulinwirkung findet man eine charakteristische Latenzzeit zwischen Hormonzugabe und dem Einsetzen der Wirkung. Hierfür wurde eine zwischen Rezeptor und Effektor zwischengeschaltete Transmitterreaktion verantwortlich gemacht.

Folgende wichtige Charakteristika der Signalübertragung wurden gefunden:

- eine Calciumbeteiligung wurde nachgewiesen,
- eine Verminderung der Oberflächendichte der Rezeptoren ließ eine Lateraldiffusion als kritischen Transmitterschritt als unwahrscheinlich erscheinen,
- kinetische Studien ergaben, daß kein Schwellenwertmechanismus für die Existenz der initialen Latenzphase verantwortlich ist,
- die Analyse der Temperaturabhängigkeit der Latenzphase in einem Arrheniusplot deutete auf eine mögliche Beteiligung der Fluidität der Plasmamembran am Kopplungsvorgang hin,

- die Stimulation durch Insulin war ATP-abhängig:

Mit Inhibitoren der Atmungskette war eine schnelle Senkung des intrazellulären ATP-Spiegels möglich. Etwa 70% Reduktion des zellulären ATP verlangsamte den Kopplungsprozess, während Bindung und Maximaleffekt des Glucosetransports nicht verändert sind. Maximale ATP-Senkung führte zu einem sofortigen Stopp der Weiterleitung des Insulinsignals, was sich in einem Sistieren der Aktivierung des Transportsystems auf dem momentanen Aktivierungsniveau zu erkennen gab, ohne eine Desaktivierung nach sich zu ziehen. Dies führte zu der Schlußfolgerung, daß die Transmitterreaktion ATP-abhängig ist, und auch die Desaktivierung ATP benötigt.

Die ATP-Verarmung führte ferner zu einer verminderten Bindung von Insulin an die Zelle. Da das zellgebundene Insulin sich zum Teil aus an Oberflächenrezeptoren gebundenes, zum Teil aus internalisiertem Insulin zusammensetzt, ist die erniedrigte Bindung durch eine Blockierung der ATP-abhängigen Internalisierung erklärbar. Dies führte zu der Arbeitshypothese, daß die Internalisierung ein signalübertragender Zwischenschritt zwischen Bindung und Glucosecarrier sein könnte. Die Internalisierung wurde daher in Chloroquin-behandelten Zellen untersucht. Es zeigte sich, daß die Internalisierung erst nach dem Beginn der Transportaktivierung einsetzte, und bei 15°C zwar eine Transportaktivierung, aber keine Internalisierung mehr nachweisbar war. Dies ließ den kausalen Zusammenhang zwischen Internalisierung und Wirkung als eher unwahrscheinlich erscheinen.

Zur Formulierung eines Modells zur Signalübertragung wurden neben den oben dargestellten, experimentell ermittelten Charakteristika Modellrechnungen durchgeführt, die im Anhang ausgeführt sind. Diese theoretischen Überlegungen zeigen, daß

- eine Carrieraktivierung durch ein dynamisches Fließgleichgewicht dargestellt werden kann,
- eine Hormonwirkung durch Störung dieses Gleichgewichts über die Bildungs- bzw. Abbaurate der Carrier erfolgen kann,
- die Latenzphase bei niedrigen Insulindosen als Bindungs-

effekt beschrieben werden kann.

Die experimentellen Daten dieser Arbeit und die damit in Einklang stehenden Modellrechnungen lassen zusammen mit den Daten aus der Literatur die Formulierung eines hypothetischen Modells zu, das vorsieht, daß unter dem Einfluß von Insulin neue Glucosecarrier von intrazellulären Strukturen in einem quasi-exozytotischem Prozess in die Plasmamembran eingebaut werden.

7. L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

1. Amatruda, J.M., Finch, E.D., J.Biol.Chem. 254 (1979)
2619 - 2625
2. Benjamin, W.B., Clayton, J.Biol.Chem. 253, 1700 - 1709, (1978)
3. Carpenter, J.G., Cohen, S., J.Cell Biol. 71, 159 - 171, (1976)
4. Carter, J., Avruch, J., Martin, D.B., J.Biol.Chem. 247,
2682 - 2688 (1972)
5. Chandramouli, V., Milligan, M., Carter, J.R., Biochemistry 16
1151 - 1157, (1977)
6. Chang, K.G., Cuatrecasas, P., J.Biol.Chem. 249 3170 - 3180
(1974)
7. Ciaraldi, T.P., Olefski, J.M., Arch.Biochem.Biophys. 193
221 - 231, (1979)
8. Clausen, T., Membr.Prot.Proc. 11th FEBS Meet.
Pergamon Press Vol. 45, 229, (1978)
9. Crofford, J., Am.J.Phys. 212, 217 (1974)
10. Cushman, S.W., Wardzala, L.J., J.Biol.Chem. 255
(1980)
11. Czech, M.P., Lynn, D.G., Lynn, W.S., J.Biol.Chem. 248
3636 - 3641 (1973)
12. Czech, M.P., Lawrence, J.C., Lynn, W.S., J.Biol. Chem. 249
5421 - 5427 (1974)
13. Czech, M.P., Am.Rev.Biochemistry 46, 359 - 384 (1977)
14. Czech, M.P., Diabetes 29, 399 - 409, (1980)

15. Eilam, Y., Stein, W.D., in Methods in Membrane Biology Vol.2
S. 283
16. Evans, E.A., Hochmuth, R.M., in Current Topics in Membranes
and Transport 10, S. 1 (1978)
17. Foley, J.E., Cushman, S.W., Salans, L.B., Am.J.Physiol.234(2)
E112 - E119 (1978)
18. Geck, P. et al. Biochim.Biophys Acta 255, 442 - 461 (1972)
19. Gliemann, J., Gammeltoft, S., Vinten, J., J.Biol.Chem 250
3368 - 3374 (1975)
20. Gliemann, J., Østerlind, K., Vinten, J., Gammeltoft, S.,
Biochim.Biophys.Acta 286 1 - 9 (1972)
21. Gliemann, J., Sonne, O., J.Biol.Chem. 253 7857 - 7863 (1978)
22. Gliemann, J., Vinten, J., Sonne, O., Membr.Prot.Proc.
11th FEBS Meet. Vol.45 Pergamon Press S.211 (1977)
23. Goldstein, J.L., Brown, M.S., J.Biol.Chem. 249
5153 - 5162 (1974)
24. Gordon, Ph., Carpentier, J.L., Freychet, P., Orci, L.,
Diabetologia 18, 263 - 274 (1980)
25. Häring, H.U., Kemmler, W., Renner, R., Hepp, K.D.,
FEBS Lett. 95 177 - 180 (1978)
26. Häring, H.U., Kemmler W., Hepp, K.D., FEBS Lett. 105
329 - 332 (1979)
27. Hammons, G.T., Jarret, L., Diabetes 29, 475 (1980)
28. Hill, T.L., Free Energie Transduction in Biology
Academic Press New York (1977)
29. Höfer, M., Transport durch biologische Membranen
Verlag Chemie Weinheim (1977)

30. Jacobs, S., Cuatrecasas, P., Biochem. Biophys. Acta 433
482 - 499
31. Jarret, L., Smith, R.M., J. Supramol. Struct. 6 45 - 59 (1977)
32. Kahn, C.R., Baird, K.L., Jarret, D.B., Flir, J.S.,
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75 4209 - 4213 (1978)
33. Kahn, C.R., Baird, K., J. Biol. Chem. 253 4900 - 4908 (1978)
34. Kobayashi, M., Olefski, J.M., Am. J. Phys. 235(1)
E53 - E63 (1978)
35. Kobayashi, M., Iwasaki, M., Shigeta, Y., J. Biochem. 88
39 - 44 (1980)
36. Kono, T., Robinson, F.W., Sarver, J.A., Vega, F.V., Pointer, R.H.,
J. Biol. Chem. 252 2226 - 2233 (1977)
37. Kotyk, A., Janacek, K., Cell membrane transport, Principles
and techniques New York Plenum Press (1975)
38. Lamprecht, W., Trautschold, I., Methoden der enzymatischen
Analyse, in Bergmeyer H.U. (Hrg.) Weinheim Verlag Chemie
1970 Bd. 2 2024 - 2033
39. Lerner, J., et al. Diabetes 79 K. Waldhäusl. (hrg.)
Amsterdam, Excerpta Medica (1980) 181 - 184
40. Livingstone, J.N., Amatruda, J.M., Lockwood, D.H.,
Am. J. Phys. 234(5) E484 - E488 (1978)
41. Löw, H., Crane, F.L., Grebing, C., Tally, M., Hall, K.,
FEBS Lett. 91 166 - 168 (1978)
42. Ludvigsen, C., Jarret, L., Diabetes 29 373 - 378 (1980)
43. Marshall, S., Olefski, J.M., J. Biol. Chem. 254
10153 - 10160 ; (1979)
44. Melchior, D.L., Czech, M.P., J. Biol. Chem. 254 8744-8747 (1979)

45. Olefski, J.M., Biochem.J. 172 137 - 145 (1978)
46. Pilch, P.F., Thompson, P.A., Czech, M.P., Proc.Natl.Acad. Sci.USA 77 915 - 918 (1980)
47. Rodbell, M., J.Biol.Chem. 239 375 - 380 (1964)
48. Rozengurt, E., Stein, W.D., Biochim.Biophys.Acta 464 417 - 432 (1977)
49. Schlessinger, J., Schlechter, Y., Willingham, M.C., Pastan, I., Proc.Natl.Acad.Sci.USA 75 2659 - 2663 и 5353 - 5357 (1978)
50. Seals, J.R., McDonald, J.M., Jarret, L.J., J.Biol.Chem. 254 6991 - 6996 (1979)
51. Siegel, J., Olefski, J.M., Biochemistry 19 2183 - 2190 (1980)
52. Silverstein, S.C., Steinman, R.M., Cohn, Z.A., Ann.Rev.Biochem. 46, 669 - 722 (1977)
53. Steinman, J., J.Cell Biol. 63 949 (1974)
54. Suzuki, K., Kono, T., J.Biol.Chem. 254 9786 - 9794 (1979)
55. Suzuki, K., Kono, T., Proc.Natl.Acad.Sci. USA 77 2542 - 2545 (1980)
56. Terris, S., Steiner, D.F., J.Biol.Chem. 250 8389 - 8392 (1975)
57. Tolkovski, A.M., Levitzki, A., Hormones and Cell Regulation Vol.2, J.Dumont и. Numetz (hrg.) Elsevier, North Holland Biomedical Press (1978)
58. Vega, F.V., Key, R.J., Jordan, J.E., Kono, T., Arch.Biochem. Biophys. 203 167 - 173
59. Vinten, J., Biochem.Biophys.Acta 511 259 - 273. (1978)

60. Vinten,J., Gliemann,J., Østerlind,K., J.Biol.Chem. 251
794 - 800 (1976)
61. Wilbrandt,B., Rosenberg, J.Gen.Phys. 41 289
62. Whitesell,R.R., Gliemann,J., J.Biol.Chem. 254
5276 - 5283 (1979)

8. A B K Ü R Z U N G E N

ATP	Adenosintriphosphat
Ci	Curie
cpm	gezählte radioaktive Zerfälle pro Minute
DNP	2,4(α)-Dinitrophenol
EDTA	Aethylendiamintetraessigsäure (Dinatriumsalz)
IZVR	Intrazellulärer Methylglucoseverteilungsraum
KCN	Kaliumcyanid
3-O-MG	3-O-(α) Methyl[D]glucose
HWZ	Halbwertszeit
NADP	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat

Lebenslauf:

26. Dez. 1951 geb. in Daaden (Westerwald) als Sohn von
Siegfried Biermann und Dr. Elisabeth Biermann
geb. Eckhardt
- 1958 - 1962 Besuch der Volksschule in Daaden
- 1962 - 1970 Besuch des Freiherr vom Stein-Gymnasiums in
Betzdorf
- 1970 - 1971 Wehrdienst bei der Bundeswehr
- 1971 - 1976 Physikstudium an der Universität (T.H.)
Karlsruhe
- 1976 Diplom
- 1976 Beginn des Medizinstudiums an der Universität
München
- Juni 1979 Beginn volliegender Doktorarbeit unter Anlei-
tung von Priv. Doz. Dr. W.Kemmler und
Dr. H.U.Häring am Institut für Diabetesfor-
schung, München (Leitung: Prof. H.Mehnert,
Prof. O.Wieland)

